

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Universidad del País Vasco

Facultad de Medicina y Enfermería

Departamento de Fisiología

# **Estado antioxidante del líquido folicular en mujeres sometidas a estimulación ovárica: implicaciones en la maduración folicular y en la fertilidad**

Tesis doctoral para optar al grado de Doctor, presentada por:

**Susana Meijide de la Fuente**

Leioa, Julio 2017

Directores de tesis:

**Luisa Henández Frías**

**M<sup>a</sup> Begoña Ruiz Larrea**

Durante la realización de esta tesis, he contado con el apoyo económico de las siguientes fuentes:

Este trabajo ha sido subvencionado por el FIS/FEDER (ref.PI11/02559), el Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, ref. IT687-13, y DCIT, ref. SPE11UN036 y SPE13UN036), la Universidad de País Vasco, UPV/EHU (ref. PES13/58) y dos becas de la Fundación Jesus de Gangoiti Barrera.

Por otro lado, han sido concedidas tres becas del departamento de dirección para la igualdad de la UPV/EHU en los años 2013, 2014 y 2016 para la participación en talleres, conferencias y seminarios para estudiantes de doctorado.







*A Marina, Ricardo, Josefa y Manolo  
y muy en especial a mi Madrina.*

*Vive como si fueras a morir mañana, aprende como si fueras a vivir  
para siempre.*

**-Mahatma Gandhi-**









# **AGRADECIMIENTOS**

*Durante estos años son muchas las personas a quienes quiero expresar con estas líneas mi gratitud por el respaldo y la confianza que me han prestado.*

*En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras de tesis Dra. Luisa Hernandez Frias y la Dra. María Begoña Ruiz Larrea por permitirme formar parte del grupo de investigación Radicales Libres y Estrés Oxidativo en la Fisiopatología Humana y por haberme mostrado su apoyo a lo largo de mi tesis doctoral.*

*Un agradecimiento especial al Dr. José Ignacio Ruiz Sanz por todo lo que me ha enseñado, por su dedicación y por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado.*

*Agradecer a todos los miembros pertenecientes a los despachos "guay y superguay" y sin olvidarme de los miembros que ya no están, o lo que es lo mismo a todos mis amigos del laboratorio, porque después de todo este tiempo ya no sois solo compañeros de trabajo. Gracias por todos esos momentos de risas y de consuelo a lo largo de todo este tiempo, sin vosotros no hubiera sido lo mismo. MUCHAS GRACIAS "Café mañanero y fanta"!!!!.*

*A Josean, a Carlos y a todo el grupo de "Colesterol" gracias por todos los momentos pasados en el laboratorio.*

*A mi familia, papa, mama y Esti gracias por haberme dado animos, haberme apoyado y haber mostrado todo ese interés por lo que estaba haciendo. Sin vuestra ayuda no hubiera llegado hasta aquí.*

*A mis amigos, Ainara y Joana que os puedo decir... si me conoceis desde los 3 años, todo lo que pueda escribir aquí ya lo sabeis seguro. A Jonatan y a Raul perdón por haber fastidiado algún que otro periodo vacacional medianamente planificado. A todas mis amigas del lugar más bonito del*

*planeta: Tamara de Campos, por ese tiempo de desconexión y felicidad a lo largo de este trabajo que me han aportado los aires de Castilla.*

*Y por último, me gustaría agradecer de una manera muy especial a Gaizka. Gracias por haberme escuchado, apoyado y haberme sabido sacar una gran sonrisa cuando lo he necesitado, gracias por estar a mi lado todo este tiempo y por haberme ayudado a levantar cuando he encontrado algún tropiezo por el camino.*

*Muchas gracias a todos por dejarme formar parte de vuestras vidas.*

*-Susana-*









# *TABLA DE CONTENIDOS*











<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
1.1 FISIOLÓGÍA DEL OVARIO.....	25
1.1.1 OVOGENESIS .....	26
1.1.2 DESARROLLO FOLICULAR .....	27
1.1.3 FISIOLÓGÍA DEL CICLO MENSTRUAL.....	31
1.2 LÍQUIDO FOLICULAR Y SUS COMPONENTES.....	33
1.3 ESTRÉS OXIDATIVO, ROS Y RNS.....	39
1.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES .....	47
1.4.1 Antioxidantes enzimáticos .....	47
1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos .....	54
1.5 ROS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN .....	59
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	73
3.2 VARIABLES DEL ESTUDIO .....	75
3.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS .....	76
3.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (TAC) .....	77
3.5 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO (ORAC).....	78
3.6 VITAMINA E .....	79
3.7 ÓXIDO NÍTRICO (NO) .....	81
3.8 ACTIVIDAD CATALASA .....	83
3.9 ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX).....	84
3.10 ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) .....	86
3.11 ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) .....	87
3.12 PON1 ARILESTERASA .....	89
3.13 PON1 PARAOXONASA .....	89
3.14 PON2 METILPARAOXONASA.....	91
3.15 PON3 SIMVASTATINASA.....	91
3.16 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PON1, PON2 Y PON3.....	94

3.17 MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE PROTEÍNAS.....	97
3.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	103
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>107</b>
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	107
4.2 PARÁMETROS DE FERTILIDAD .....	108
4.3 COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO FOLICULAR .....	109
4.3.1 <i>Parámetros bioquímicos del líquido folicular.....</i>	<i>109</i>
4.3.2 <i>Estado antioxidante del líquido folicular.....</i>	<i>110</i>
4.4 ANÁLISIS DEL LÍQUIDO FOLICULAR EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO FOLICULAR Y DE LA POBLACIÓN .....	111
4.4.1 <i>Parámetros bioquímicos .....</i>	<i>111</i>
4.4.2 <i>Actividad antioxidante total (TAC y ORAC).....</i>	<i>112</i>
4.4.3 <i>Vitamina E.....</i>	<i>113</i>
4.4.4 <i>Óxido nítrico.....</i>	<i>114</i>
4.4.5 <i>Superóxido dismutasa.....</i>	<i>115</i>
4.4.6 <i>Catalasa .....</i>	<i>115</i>
4.4.7 <i>Glutación peroxidasa.....</i>	<i>116</i>
4.4.8 <i>Glutación S-transferasa.....</i>	<i>117</i>
4.4.9 <i>Sistema paraoxonasa.....</i>	<i>118</i>
4.5 ESTUDIO DE CORRELACIONES DE LA COMPOSICIÓN Y ESTADO ANTIOXIDANTE DEL LF Y LOS PARÁMETROS DE FERTILIDAD .....	125
4.6 CICLOS PRODUCTIVOS <i>VERSUS</i> CICLOS NO PRODUCTIVOS .....	132
4.7 MODIFICACIONES OXIDATIVAS PROTEICAS .....	133
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>169</b>











# *INTRODUCCIÓN*









# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 FISIOLÓGÍA DEL OVARIO

Los ovarios son estructuras pares y ovaladas que se encuentran alojadas en la pelvis y fijadas a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal llamado mesovario a través del cual recibe el aporte vasculo-nervioso. El ovario mantiene su posición a la entrada de las trompas de Falopio y se encuentra unido al útero gracias al mesovario y a estructuras fibromusculares.

En el ovario se distinguen tres regiones perfectamente delimitadas: la médula central, el cortex externo y el hilio interno. La médula central está compuesta por una colección celular heterogénea; el córtex está formado por células germinales (ovocitos) rodeados de complejos celulares formando los folículos ováricos, los cuales están recubiertos por un epitelio celómico denominado epitelio germinal; y el hilio lo conforman vasos, nervios, linfocitos, tejidos de sostén y las células hiliares (*Tresguerres, 2005*) (Fig. 1.1). El folículo ovárico es la unidad fundamental del cortex, donde se producirán una serie de cambios coincidentes con el grado de diferenciación y desarrollo de los ovocitos contenidos en su interior. Estos cambios están vinculados a las dos funciones del ovario: secretar hormonas a partir de la pubertad y proporcionar los óvulos.

El ovario sintetiza dos tipos de hormonas: las hormonas esteroideas (fundamentalmente estrógenos y progesterona, aunque también pequeñas cantidades de andrógenos) y hormonas no esteroideas (relaxina, inhibina y activina) (*Botella, 2007*).

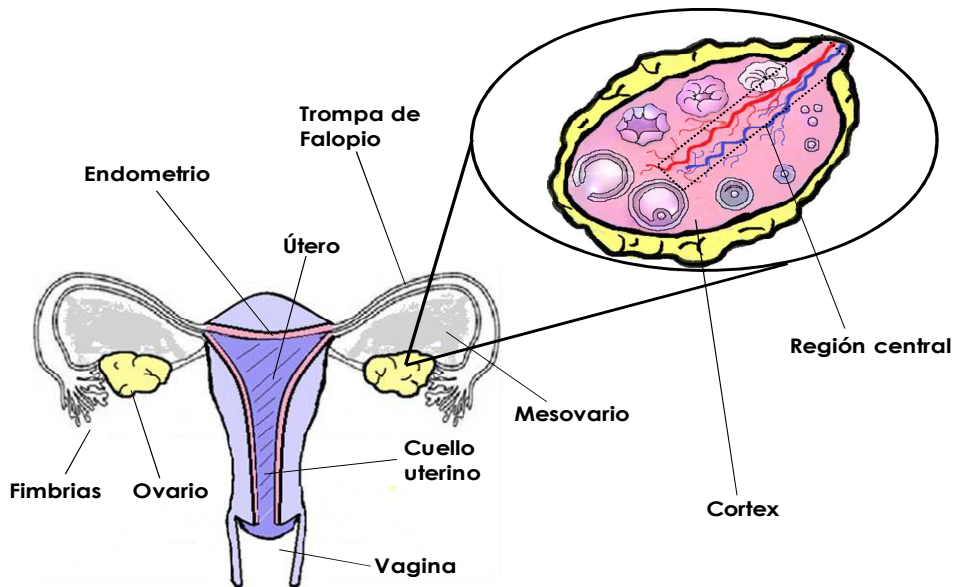
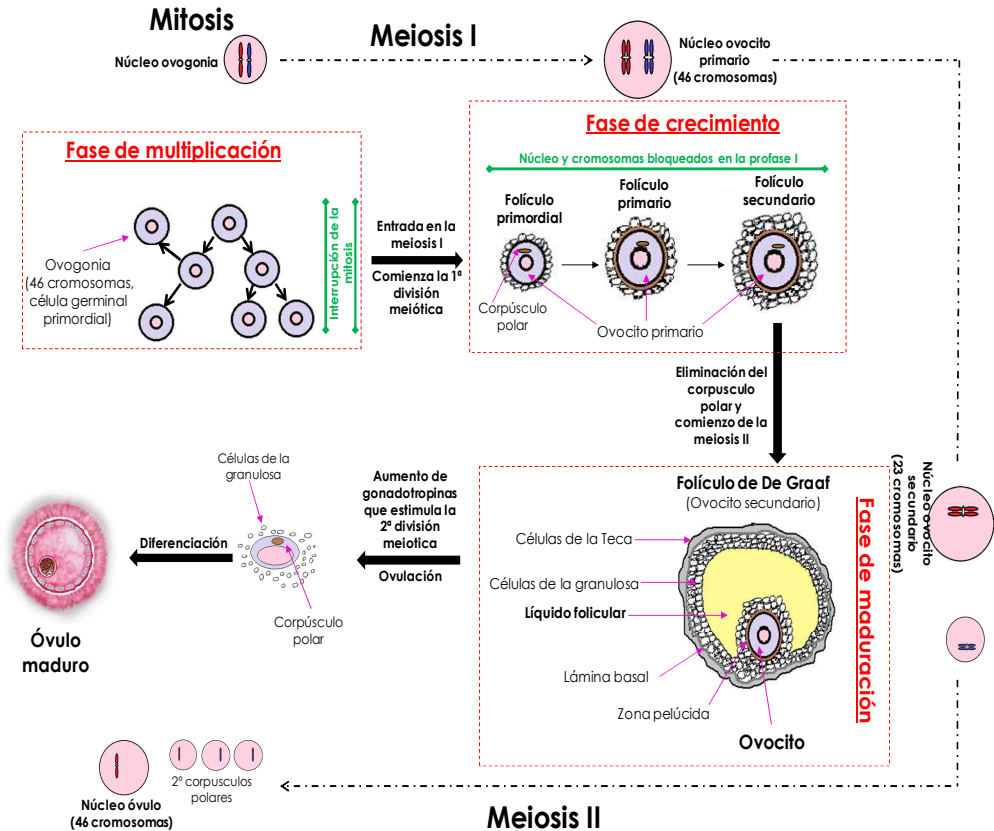


Figura 1.1. Órgano reproductor femenino.

### 1.1.1 OVOGENESIS

Las células germinales femeninas proceden de las ovogonias formadas en la quinta semana de gestación. A partir del segundo mes de vida fetal algunas ovogonias interrumpen su mitosis y entran en la profase de su primera división meiótica dando lugar a los ovocitos primarios. En estos ovocitos primarios el núcleo y los cromosomas quedan bloqueados en la profase de la primera división meiótica hasta el momento de la ovulación, en que se reanuda la meiosis, se elimina el primer corpúsculo polar y se forma el ovocito secundario. Durante este largo período que va desde la formación del ovocito primario hasta la ovulación, estas células siguen creciendo y acumulando gran cantidad de citoplasma, hasta medir en su madurez alrededor de 80  $\mu\text{m}$ . Una vez que el ovocito ha completado su desarrollo, el folículo que lo contiene sigue creciendo hasta medir de 15 a 20  $\mu\text{m}$  en el momento previo a la ovulación. Antes de la ovulación, se inicia la meiosis II que se detiene pocas horas antes de la misma. Sólo si el ovocito es fecundado en las trompas de Falopio por un

espermatozoide ocurrirá el último paso de la maduración del ovocito secundario, con extrusión del segundo corpúsculo polar y formación del óvulo maduro.



**Figura 1.2. Maduración ovocitaria.** Se muestra desde el periodo fetal en el que se produce la proliferación celular mediante mitosis sucesivas, pasando por el proceso de meiosis, hasta llegar al óvulo maduro.

### 1.1.2 DESARROLLO FOLICULAR

El proceso de maduración del ovocito ocurre en los folículos, responsables también de la producción hormonal. El folículo está formado desde su génesis por una o varias capas de células de la granulosa alargadas que rodean al ovocito, a su vez delimitadas del estroma adyacente por una lámina basal. El



complejo ovocito-células de la granulosa rodeado por la lámina basal se denomina folículo primordial.

Durante el quinto y sexto mes de gestación algunos de estos folículos primordiales inician su maduración, y las células de la granulosa se convierten en una capa única de células cuboides maduras que comienzan a dividirse. Estos folículos, denominados ahora primarios, aumentan de tamaño incrementando sus capas celulares granulosas, las cuales secretan mucopolisacáridos y dan lugar a una capa translúcida que rodea al ovocito y que se denomina membrana pelúcida. A través de ella las células de la granulosa en respuesta a la hormona foliculoestimulante, FSH, emiten prolongaciones citoplasmáticas mediante las cuales mantienen un estrecho contacto con la membrana del ovocito.

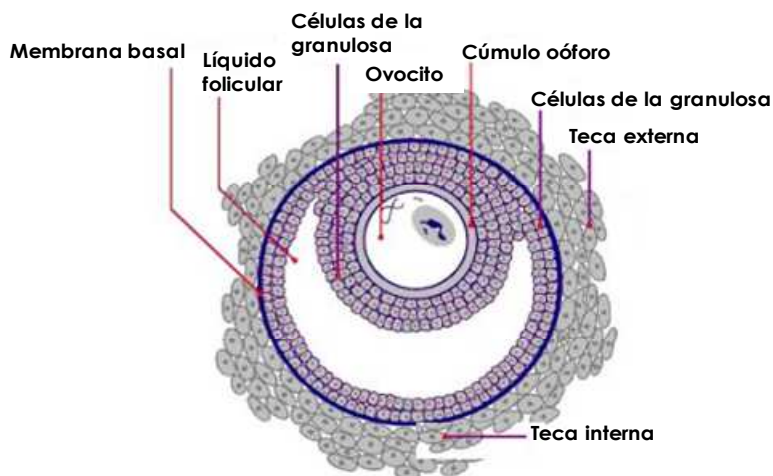
Una vez comienza la proliferación de las células de la granulosa, pueden observarse por fuera de la lámina basal cambios en el estroma cortical, que dan lugar a la aparición de una serie de capas concéntricas de células alargadas denominadas tecales.

A medida que crecen y proliferan las células granulosas y tecales el folículo aumenta notablemente de tamaño, y cuando llega a los 200  $\mu\text{m}$  se empieza a acumular líquido entre las células de la granulosa, que confluyen a la vez que incrementan su tamaño, y dan lugar a una cavidad central llena de líquido, llamada antro. Al folículo con estas características se le denomina folículo de De Graaf; en él el ovocito ocupa una posición excéntrica y se encuentra rodeado de dos a tres capas de células de la granulosa, dando lugar al cúmulo oóforo, que está unido al resto de las células de la granulosa por uno de sus lados.

En la mujer adulta (entre la época puberal y la menopausia) cada mes ocurren una serie de cambios hormonales que culminan con la liberación por parte del ovario de un óvulo fecundable en lo que constituye el ciclo menstrual ovulatorio normal, que será descrito en el siguiente apartado.

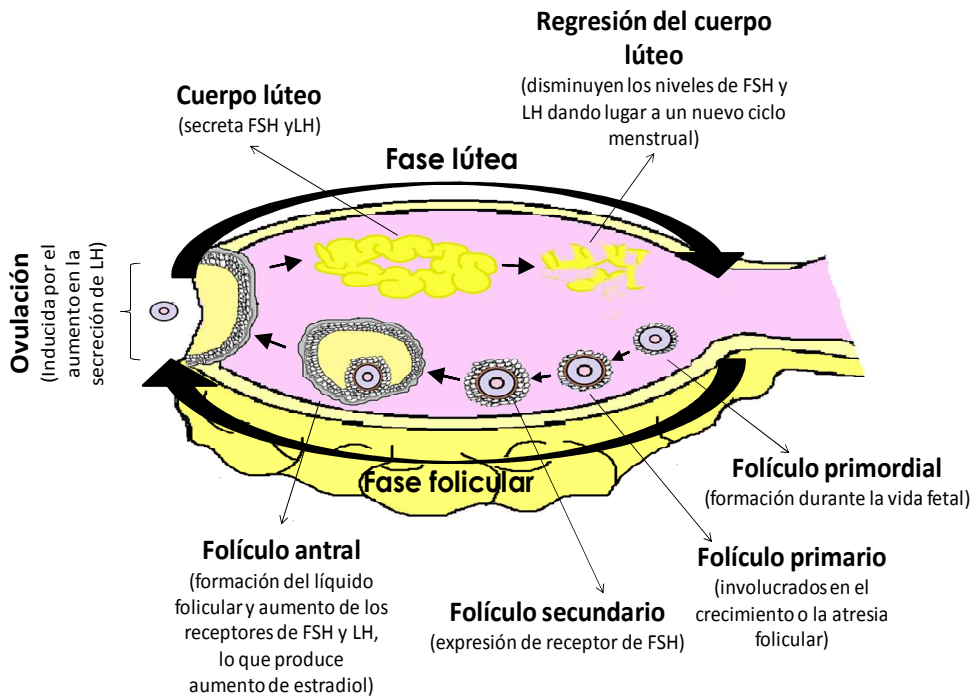
En los ovarios en el momento del nacimiento hay aproximadamente dos millones de folículos primordiales. Entre la época del nacimiento y la pubertad gran parte de estos folículos experimenta un proceso de atrofia, de forma que sólo unos 400.000 gametos están presentes en el ovario de la mujer que comienza su vida fértil. De éstos, sólo alrededor de 400 tendrán la oportunidad de madurar por completo y de pasar a las trompas de Falopio, donde serán potencialmente fecundados, mientras que el resto sufrirá un proceso de atresia.

A partir de la pubertad un número considerable de folículos de los existentes en el ovario inicia su desarrollo cada mes. Sin embargo, sólo uno será capaz de madurar hasta convertirse en folículo de De Graaf (con todas sus estructuras: teca externa, teca interna, varias capas de células de la granulosa y cúmulo oóforo). El folículo de De Graaf al romperse liberará el ovocito con la corona radiada (células de la granulosa) a la cavidad abdominal, donde será captado por las fimbrias de la trompa ipsilateral y transportado al interior del útero. La ruptura de la membrana folicular parece tener lugar por acción de un activador del plasminógeno presente en el líquido folicular. El proceso de ruptura folicular podría estar mediado también por una especie de reacción inflamatoria local dependiente de histamina, por colagenasas o por la contracción folicular inducida por prostaglandinas (Ng y cols., 2015).



**Figura 1.3. Folículo de De Graaf.** Es el folículo preovulatorio. Alcanza alrededor de 2,5 cm de diámetro y sobresale en la superficie de la corteza ovárica.

A partir de los restos foliculares hemorrágicos que quedan en el ovario se producirá una transformación de estas células para formar el cuerpo lúteo, responsable de la secreción hormonal en la segunda parte del ciclo.

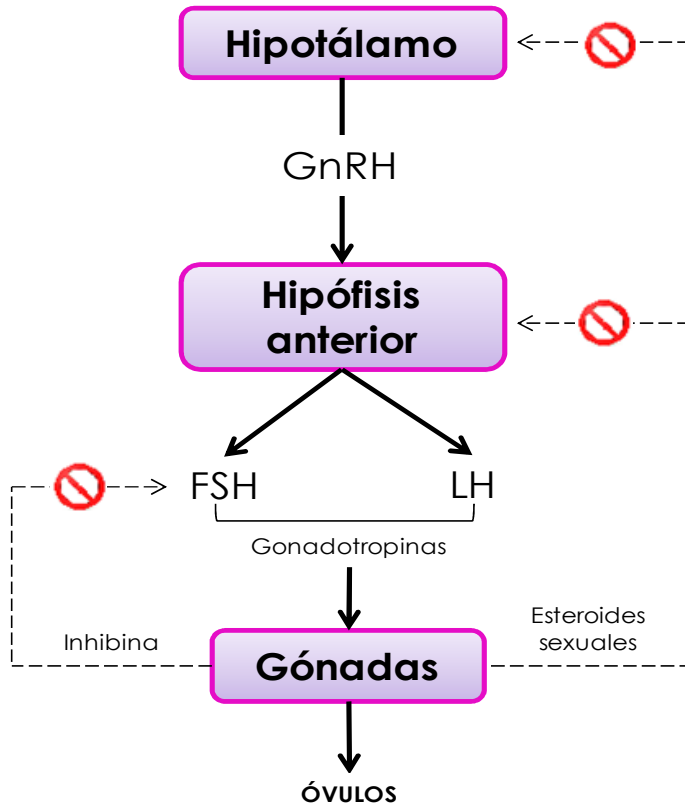


**Figura 1.4. Desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo.** Se describen las fases en el desarrollo folicular desde los folículos primordiales hasta la ovulación, formación del cuerpo lúteo y degradación del mismo para dar lugar a un nuevo ciclo ovulatorio.

### 1.1.3 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA

El eje de la reproducción y la maduración sexual está regulado por un mecanismo neurohumoral originado en el hipotálamo por la liberación periódica pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH. En respuesta a la liberación de GnRH, la glándula hipofisaria libera gonadotropinas (hormona foliculoestimulante, FSH, y hormona luteinizante, LH) en forma de pulsos al torrente sanguíneo. Estas hormonas son responsables de la maduración gonadal y la esteroidogénesis. La periodicidad y la amplitud de estos pulsos de GnRH y de gonadotropinas son fundamentales en la funcionalidad del eje reproductor.

Aunque el estímulo principal para la liberación de gonadotropinas es la GnRH, su liberación se encuentra modulada por diversas hormonas como estradiol y progesterona por un mecanismo complejo de retroalimentación.



**Figura 1.5. Eje hipotálamo-hipófisis-ovárico.** Las hormonas esteroideas secretadas por el ovario ejercen retroinhibición sobre la secreción de GnRH y de gonadotropinas. La hormona polipeptídica inhibina regula por retroinhibición la secreción de FSH.

### 1.1.3 FISIOLÓGÍA DEL CICLO MENSTRUAL

Desde el comienzo de la pubertad y hasta la menopausia el ovario produce una serie de secreciones hormonales cíclicas que, a través de su acción, darán lugar al ciclo menstrual. El hecho más importante del ciclo es la liberación del óvulo fecundable; sin embargo, el fenómeno macroscópico más evidente es el

sangrado menstrual, consecuencia de la acción coordinada hormonal ovárica sobre el endometrio uterino. Igualmente existe un proceso cíclico sobre otras estructuras del tracto reproductivo como trompas, útero, vagina, vulva y mamas, en función de los cambios hormonales periódicos a los que da lugar el ovario.

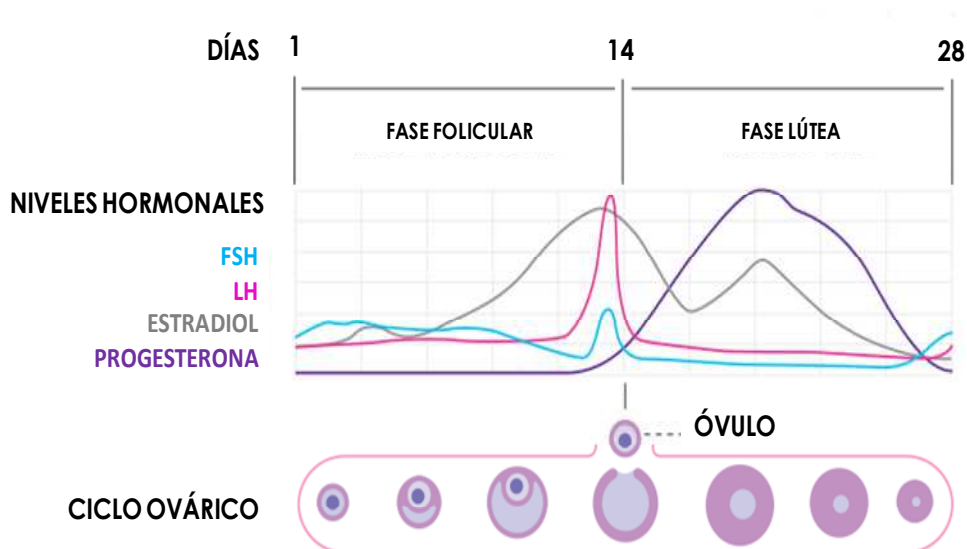
Por consenso, el primer día del ciclo es el primer día de la menstruación. Está dividido en dos fases: folicular y lútea. La fase folicular comienza con el principio de la menstruación y termina el día del pico de LH, y la fase lútea comienza el día del pico de la LH y termina al iniciarse la siguiente menstruación. La duración media del ciclo es de 28 días, con 14 días para cada fase

Al comienzo de la fase folicular las secreciones de hormonas esteroideas están en su grado más bajo y los ovarios solo contienen folículos primordiales y primarios. Hacia el término de la fase folicular un folículo de un ovario alcanza la madurez y se convierte en un folículo de De Graaf. Al crecer los folículos las células de la granulosa secretan una cantidad creciente de estradiol, que llega a su máxima concentración dos días antes de la ovulación. El crecimiento de los folículos y la secreción de estradiol son estimulados y dependen de la FSH secretada por la adenohipófisis. Hacia el final de la fase folicular la FSH y el estradiol también estimulan la producción de receptores de LH en el folículo de De Graaf, lo que le prepara para el siguiente paso.

El aumento de la secreción de estradiol en la fase folicular actúa sobre el hipotálamo, aumentando la frecuencia de las pulsaciones de GnRH, lo que conlleva un incremento de la secreción de LH. Este incremento culmina con un pico de secreción de LH, resultando en la ovulación.

Después de la ovulación el folículo vacío es estimulado por LH para convertirse en el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo secreta estradiol y progesterona. Las altas concentraciones de progesterona y estradiol ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de FSH y LH. Ésta provoca el retraso de la aparición de nuevos folículos, lo que evita múltiples ovulaciones en los días sucesivos al ciclo. A medida que pasan los días la función del cuerpo lúteo disminuye, de

manera que el estradiol y la progesterona descienden a concentraciones muy bajas, lo que provoca la menstruación y permite el avance de un nuevo ciclo.



**Figura 1.6. Ciclo ovárico.** Se muestran los niveles de estradiol, progesterona, LH y FSH durante el ciclo menstrual.

## 1.2 LÍQUIDO FOLICULAR Y SUS COMPONENTES

El líquido folicular se encuentra en el interior de los folículos de De Graaf en la cavidad antral rodeando al óvulo (Gonzalez-merlo y cols., 2003). Es generado durante la foliculogénesis en un proceso que comienza en el córtex del ovario en el momento en el que se empiezan a formar los folículos primordiales. Está formado, en parte, por secreciones procedentes de las células foliculares y, en parte, es un exudado del plasma (Fortune, 1994). Su composición refleja cambios en los procesos secretores de las células de la granulosa y de la teca interna, así como alteraciones en la composición del plasma debidas a procesos fisiológicos o patológicos. Por otro lado, la barrera folicular sanguínea juega un papel central en la composición del líquido folicular mediante la regulación de la transferencia de proteínas con un peso molecular de hasta 500 kDa (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010).

El líquido folicular es un fluido ligeramente viscosa de color amarillo y pH superior a 7, formado por una mezcla compleja de proteínas, metabolitos e iones. La composición del líquido folicular es un reflejo del grado de desarrollo ovocitario y folicular (*Appasamy y cols., 2008; Fahiminiya y cols., 2010; Hashemitabar y cols., 2014; Mason y cols., 1994; Monteleone y cols., 2008; Ocal y cols., 2004*). Así, se ha observado que alteraciones de su composición se asocian a una menor capacidad reproductiva (*Ocal y cols. 2004; Wu y cols., 2012*). Por tanto, es razonable suponer que las características del líquido folicular desempeñan un papel importante en la calidad del ovocito e influyen en el proceso de fertilización y en el desarrollo embrionario. Por eso es fundamental conocer la composición del mismo.

Los principales componentes del líquido folicular son: proteínas de origen mayoritariamente plasmático (*Carson y Bowman, 1981*), hormonas, mucopolisacáridos, anticoagulantes, así como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y factores de crecimiento tales como EGF y TGF $\alpha$ , aminoácidos, glucosa y lípidos (*Hsieh y cols., 2009; Hennet y Combelles, 2012*).

Se presenta a continuación una descripción de la composición del líquido folicular incidiendo en aquellos compuestos con valor predictivo de la calidad ovocitaria.

- **Aminoácidos.** Su composición en el líquido folicular está relacionada con el desarrollo embrionario y puede servir como un predictor de la calidad ovocitaria. La glicina y la alanina en modelo bovino (*Sinclair y cols., 2008*) y el ácido aspártico en humano (*D'Aniello y cols., 2007*) parecen ser los más importantes a este respecto.

- **Hormonas:** gonadotropinas, hormona de crecimiento (GH), esteroides sexuales, corticoides y prolactina (*Wang, 2005*). Las concentraciones intrafoliculares de FSH y LH dependen de los niveles circulantes de las mismas, que en el caso de mujeres sometidas a ciclos FIV están determinadas por la cantidad de gonadotropinas administradas exógenamente. Las gonadotropinas (FSH, LH y hCG) están involucradas en el crecimiento y desarrollo del folículo, y altas concentraciones promueven la maduración del

ovocito y se asocian con el número de ovocitos que tienen una alta probabilidad de ser fertilizados (*Enien y cols., 1998; Mendoza y cols., 2002*).

Los folículos antrales producen una gran cantidad de esteroides y están implicados en diversas etapas a lo largo del ciclo reproductivo. Un ambiente estrogénico intrafolicular está asociado con un buen crecimiento folicular y tiene efectos antiatrésicos. El estradiol mejora la maduración de los ovocitos (*Tesarik y Mendoza, 1997*). Con respecto a los andrógenos, aunque un ambiente predominantemente androgénico puede inducir atresia folicular y niveles elevados de testosterona se asocian a ovocitos de menor calidad (*Uehara y cols., 1985*), una cierta cantidad de andrógenos es necesaria para obtener un crecimiento folicular óptimo (*De Placido y cols., 2005; Lisi y cols., 2002*).

La progesterona es el componente hormonal más abundante del líquido folicular y es importante en las etapas finales del desarrollo folicular y en la ovulación (*Gougeon, 2010*). Los niveles de progesterona se ven afectados con la edad de la mujer, aumentando con el envejecimiento (*de los Santos, 2013*).

Se ha visto que también los corticoides en el líquido folicular son importantes para lograr la maduración final de los ovocitos y la posterior implantación de embriones, dado que una elevada relación cortisol/cortisona folicular está asociada con la probabilidad de embarazo en la FIVTE (*Keay y cols., 2002; Lewicka y cols., 2003*).

- **Factores de crecimiento:** inhibinas, activinas, hormona antimulleriana (AMH) y proteína morfogénica ósea (BMP).

Las inhibinas son producidas por las células de la granulosa y sus niveles en el líquido folicular indican la actividad de las células de la granulosa de cada folículo. En el líquido folicular altos niveles de inhibina A y B se asocian con una mejor respuesta ovárica, pero no se observa relación con la tasa de fertilización y de embarazo (*Wen y cols., 2006; Fried y cols., 2003; Ocal y cols., 2004*).



También se encuentran presentes en el líquido folicular varios IGF (factor de crecimiento insulínico), como IGF-II, así como IGFBP-3 e IGFBP-4 (proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico) que están implicados en la fertilización de ovocitos y en la escisión, desarrollo y morfología del embrión (*Wang y cols., 2006*). Los niveles de IGF-I y IGFBP-1 en líquido folicular se correlacionan positivamente con la calidad y madurez ovocitaria (*Artini y cols., 1994*). Por otro lado, aunque también se encuentran en el líquido folicular, no se ha observado correlación con la calidad del embrión ni con el resultado de la FIV para los factores de crecimiento: TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), EGF (factor de crecimiento epidérmico) y BFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) (*Asimakopoulos y cols., 2008*).

EL factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene un papel potencialmente importante que afecta a la angiogénesis y la regulación de los niveles de oxígeno intrafolicular. Los niveles de VEGF en líquido folicular se correlacionan significativamente con el grado de vascularización del folículo (*Monteleone y cols., 2008*). Altos niveles de VEGF también se han asociado con tasas pobres de concepción en la FIV (*Van Blerkom y cols., 1997*).

- **Interleuquinas.** Proceden tanto del plasma como de la síntesis local por células de la granulosa luteinizadas.

- **Prostaglandinas.** Las prostaglandinas desempeñan un papel central en la ruptura folicular durante la ovulación. Se ha propuesto que la PGF $2\alpha$ , secretada por las células de la granulosa bajo la estimulación ejercida por las gonadotropinas, es un marcador bioquímico de la calidad del ovocito (*Suchanek y cols., 1988*). Por otra parte, las concentraciones de PGE $2$  y PGF $2\alpha$  en el líquido folicular son mayores en los folículos que contiene ovocitos maduros (*Jeremy y cols., 1987*).

- **Carbohidratos.** La glucosa es el azúcar mayoritario en el líquido folicular, ya que representa el 80% de los carbohidratos totales. Es la principal fuente de energía para el metabolismo de ovario.

- **Lípidos.** A diferencia del plasma, las HDL son las lipoproteínas mayoritarias en el líquido folicular y por tanto la fuente principal de lípidos de este fluido. Colesterol, principalmente colesterol-HDL, triglicéridos y ácidos grasos se encuentran presentes en el líquido folicular de mamíferos (*Valckx y cols., 2012*), siendo el oleico, el linoléico y el palmítico los ácidos grasos más abundantes y que se correlacionan débil aunque significativamente con los niveles en suero (*Jungheim y cols., 2011*). La HDL es la principal suministradora de colesterol para la síntesis *de novo* de hormonas esteroideas y además poseen capacidad antioxidantes gracias a sus componentes proteicos (*Browne y cols., 2008*).

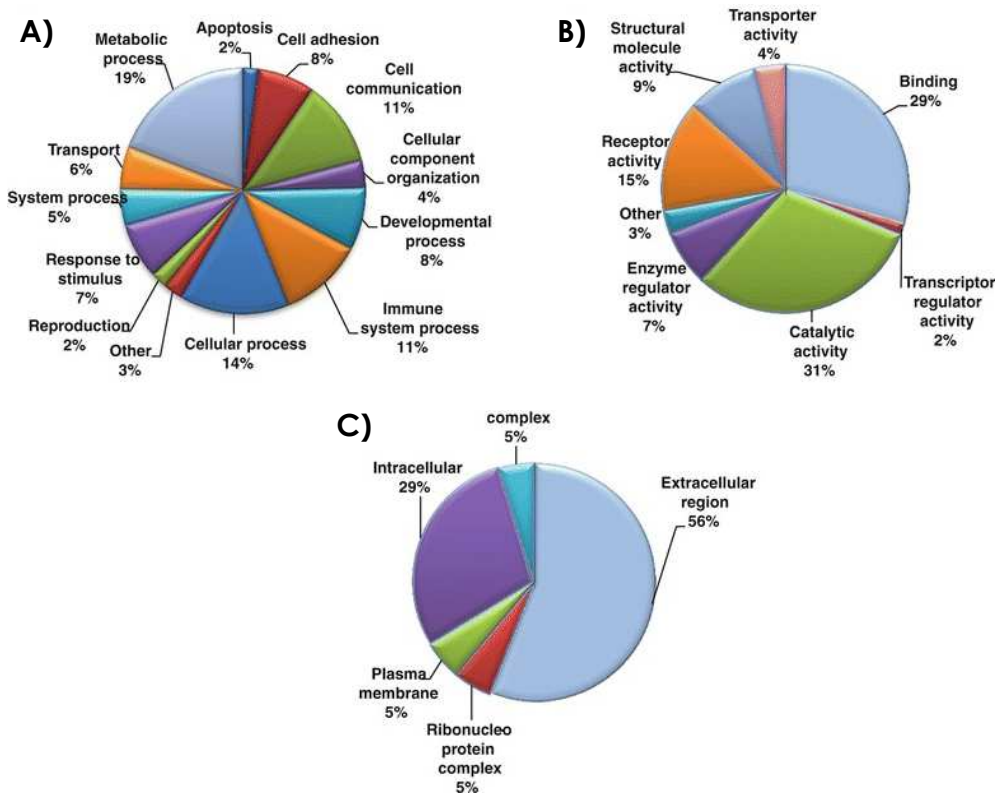
Los principales fosfolípidos del líquido folicular son fosfatidilcolina, fosfatidiletanilamina, esfingomiélna, fosfatidilinositol y cardiolipina (*Cordeiro y cols., 2014*). Estos lípidos pueden estar implicados en respuestas hormonales y procesos del desarrollo ovocitario y pueden ser útiles como biomarcadores para la intervención terapéutica en mujeres con una respuesta ovárica deficiente (*Cataldi y cols., 2013*).

La tasa de maduración de los ovocitos puede variar dependiendo de la concentración de fosfolípidos en el líquido folicular. El nivel de fosfolípidos en el líquido folicular puede afectar también a la tasa de fertilización (*Fayez y cols., 2014*).

- **Proteínas.** El líquido folicular es rico en proteínas procedentes del plasma o secretadas de las células de la granulosa y de la teca. Diferentes estudios describen el perfil proteico del líquido folicular (*Angelucci y cols., 2006; Ambekar y cols., 2013; Estes y cols., 2009; Jarkovska y cols., 2010*). En un estudio que compara el proteoma del líquido folicular con la lista de 1929 proteínas plasmáticas elaborada a partir de 91 experimentos se mostró la existencia de 585 proteínas comunes a ambos fluidos (*Farrah y col., 2011*).

La mayoría de las proteínas del líquido folicular detectadas están involucradas en procesos metabólicos (19%), procesos celulares (14%), comunicación celular (11%) y respuesta inmunitaria (11%). Contiene múltiples proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria, como es de esperar, ya que la ovulación es un proceso asociado a la inflamación. En cuanto a su función

molecular se encontró que un 31% de las proteínas tenían actividad catalítica, mientras que la clasificación basada en la localización indicó que el 56% eran extracelulares (Zamah y cols., 2015).



**Figura 1.7. Análisis de las proteínas identificadas en el líquido folicular humano.** Las proteínas se clasificaron según A) los procesos biológicos, B) la función molecular, y C) el compartimento celular. Los resultados se muestran como porcentaje de los genes clasificados en una categoría sobre el número total de cada clase (Zamah y cols., 2015).

El análisis completo del líquido folicular proporcionará información sobre el proceso de crecimiento y maduración del ovocito, así como la posibilidad de identificar biomarcadores de la calidad ovocitaria distintos a los parámetros morfológicos actualmente utilizados, lo que permitirá elegir los ovocitos de mejor calidad con la consiguiente mejora en la tasa de éxito de los tratamientos de reproducción asistida.

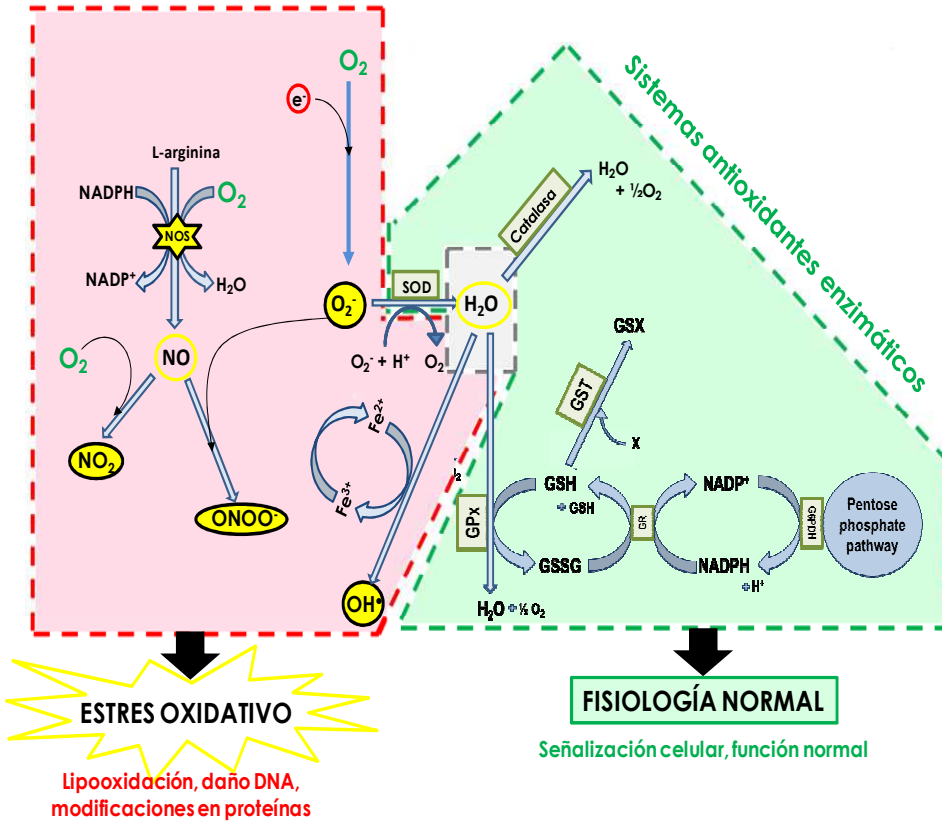
### 1.3 ESTRÉS OXIDATIVO, ROS Y RNS

Se conoce como estrés oxidativo la situación en la que tiene lugar un desequilibrio entre prooxidantes (radicales libres o especies reactivas derivadas del oxígeno y nitrógeno) y antioxidantes a favor de los primeros. Esto ocurre cuando hay un aumento de la producción de los primeros o una disminución de su eliminación (Sies, 1997).

Los radicales libres son especies químicas, cargadas o no, que en su estructura electrónica presentan un electrón desapareado o impar en orbitales externos, lo que les da una configuración espacial generadora de gran inestabilidad. Son capaces de existir en forma independiente y se producen en todas las células, pudiendo éstas quedar expuestas a los efectos dañinos de los radicales libres.

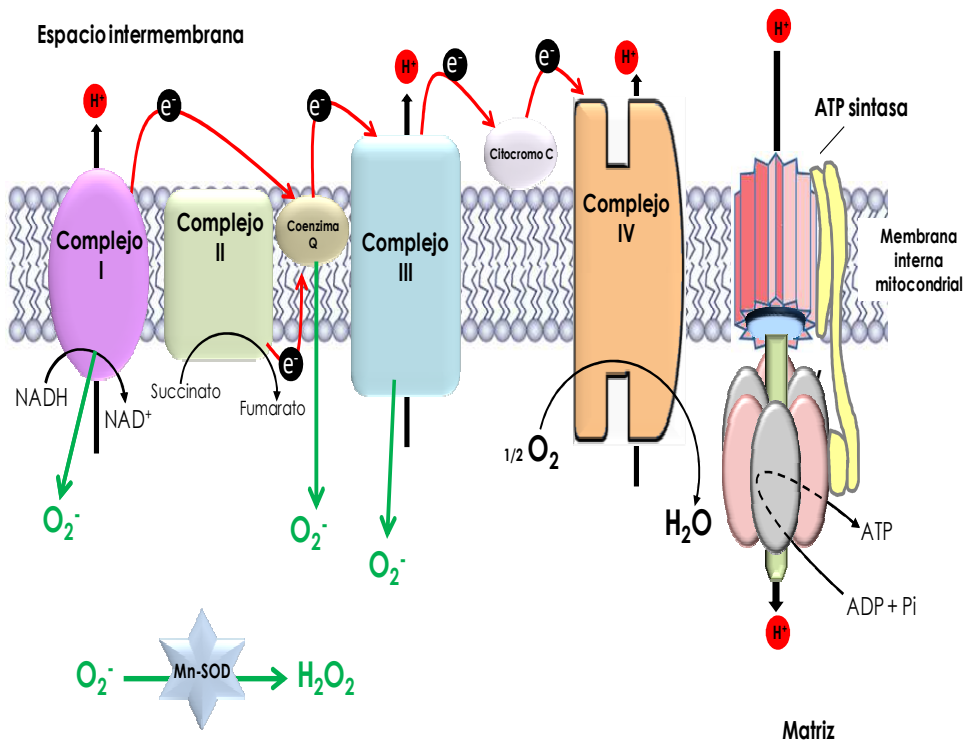
Debido al metabolismo celular, durante determinados procesos fisiológicos se producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Este es un término genérico utilizado para referirse tanto a los radicales libres oxigenados, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), como a otros derivados del oxígeno no radicalarios con capacidad de generar radicales libres, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Halliwell y Gutteridge, 1990). Son muy reactivos y tienen una vida media corta. Los ROS se generan a partir de diversas fuentes como la cadena transportadora de electrones mitocondrial (principal fuente celular generadora de ROS) (Goossens y cols., 1999) y las reacciones enzimáticas en las que se produce  $O_2^-$  catalizadas por NADPH oxidasas (Van Heerebeek y cols., 2002), lipoxigenasas (Kuhn y Thiele, 1999) y ciclooxigenasas (Kuehl y Egan, 1980).

**Formación de ROS y propagación**



**Figura 1.8. Esquema de la producción de ROS y de las principales vías enzimáticas antioxidantes.** NOS: óxido nítrico sintasa; NO: óxido nítrico; NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrógeno; ONOO<sup>-</sup>: anión peroxinitrito; OH<sup>\*</sup>: radical hidroxilo; SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión; GSSG: disulfuro de glutatión; GST: glutatión S-transferasa; X: xenobiótico; GSX: conjugado de glutatión con xenobiótico; GR: GSSG reductasa; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

La mitocondria es la principal fuente de ROS en la célula. NADH y FADH<sub>2</sub> generados en el ciclo de Krebs se oxidan en reacciones catalizadas por diferentes complejos localizados en la membrana interna mitocondrial (Fig. 1.9). El flujo de electrones a través de la cadena respiratoria termina con la reducción total del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Sin embargo, algunos de estos electrones pueden desviarse y participar en la reducción parcial del O<sub>2</sub>, haciendo que éste gane un electrón, convirtiéndose en O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el cual dismuta rápidamente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fridovich, 1986).



**Figura 1.9. Generación de especies reactivas de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial.**

Las especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS) incluyen especies que pueden o no ser radicales libres. Entre los RNS se incluyen óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) y el potente oxidante anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Augusto y cols., 2002).

El NO es uno de los radicales libres de interés en medicina debido a que es una molécula de señalización que está involucrada en numerosos procesos biológicos. Tiene una vida media de varios segundos y está presente en prácticamente todos los tejidos. Debido a su bajo peso molecular y a sus propiedades lipofílicas difunde fácilmente a través de las membranas celulares (Esper y cols., 2006). Este compuesto se forma a partir de la L-arginina en reacciones catalizadas por un tipo de enzimas denominadas genéricamente óxido nítrico sintasas (NOS) (Fig 1.10).

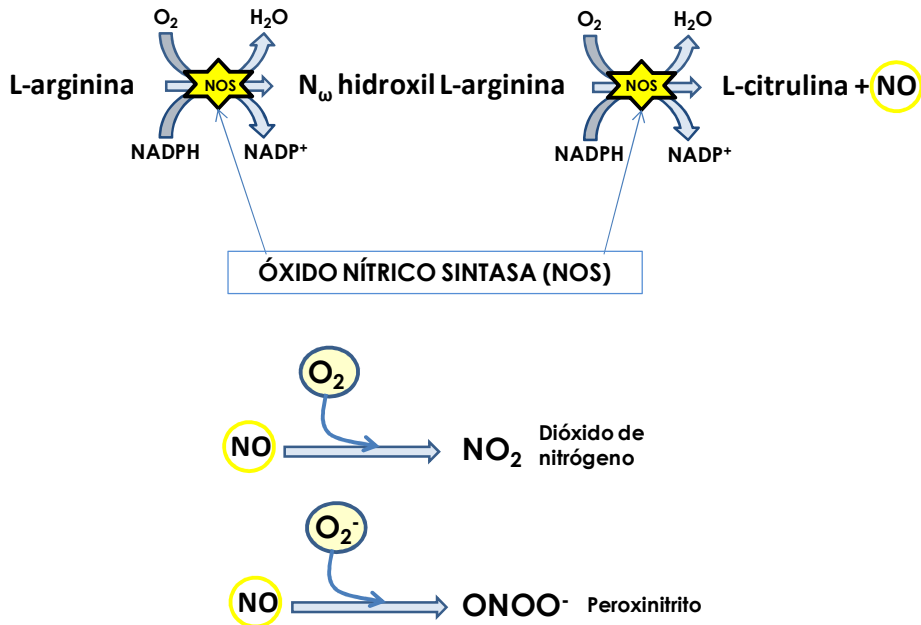


Figura 1.10. Formación de distintas especies reactivas de nitrógeno a partir de L-arginina.

El NO reduce la permeabilidad vascular, la síntesis de moléculas de adhesión linfocitarias, la agregación plaquetaria, la inflamación tisular, el crecimiento, la proliferación y migración celular e inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias y proaterogénicas, lo que favorece la fibrinólisis. Debido a estas propiedades, se considera que el NO es una molécula antiaterogénica (Esper y cols., 2006).

Niveles altos de ROS y RNS provocan daños en macromoléculas, lípidos, proteínas y DNA. Así, los radicales libres son capaces de iniciar procesos de peroxidación de lípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, induciendo pérdida de la función de las membranas y aumento de la permeabilidad. La lipoperoxidación se inicia cuando un radical libre abstrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado. Se forma un radical alquilo que reacciona rápidamente con O<sub>2</sub>, generando un radical peroxilo. Este radical abstrae un átomo de hidrógeno de un nuevo ácido graso, dando lugar a reacciones en cadena que finalizan cuando dos radicales libres reaccionan entre sí generando una especie no radicalaria o cuando un antioxidante como el tocoferol cede el hidrógeno dando lugar a un radical estable.

### **MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE PROTEÍNAS**

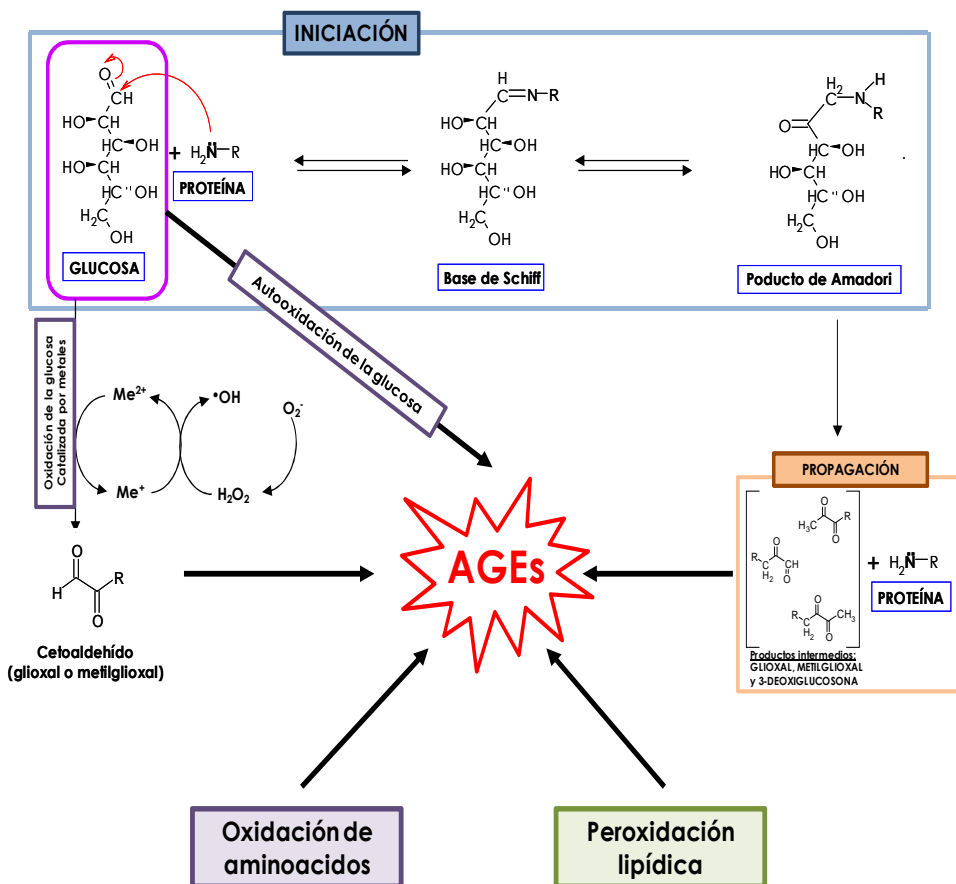
El estrés oxidativo provoca modificaciones específicas en las proteínas que alteran la estructura y/o función de la proteína oxidada (*Berlett y Stadtman, 1997*). Una de estas modificaciones es la carbonilación, que altera la conformación del polipéptido y, con ello, provoca su inactivación total o parcial (*Thorpe y Baynes, 2003*).

Estructuralmente la carbonilación puede ser fruto de la oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos, principalmente Pro, Arg, Lys y Thr, dando lugar a la formación de semialdehído glutámico (GSA) y semialdehído aminoalifático (AASA) (*Requena y cols., 2001*), los productos carbonilados mayoritarios de la oxidación de proteínas catalizada por metales. Además, los grupos carbonilo pueden introducirse en las proteínas por reacciones secundarias de las cadenas laterales de residuos de Cys, His y Lys con especies carboniladas generadas durante la peroxidación lipídica (reacciones de lipoperoxidación) o formadas como consecuencia de reacciones con azúcares reductores (*Ulrich y Cerami, 2001; Bucala y cols., 1994; Sadowska y Bartosz, 2015*). En comparación a los radicales libres, las especies carboniladas reactivas son estables y pueden difundir por toda la célula, e incluso salir fuera de ella, atacando dianas muy alejadas de su lugar de formación. Por eso, estos intermediarios reactivos solubles no solo son tóxicos *per se*, sino que además son mediadores y propagadores del estrés oxidativo y del daño tisular, actuando como segundos mensajeros citotóxicos.

A las reacciones de las proteínas con compuestos carbonílicos reactivos se las conoce como reacción de Maillard o reacción carbonilo-amino (*Thorpe y Baynes, 2003*). La reacción de Maillard clásica o glicación no enzimática de proteínas consiste en la reacción entre el grupo carbonilo de azúcares reductores como la glucosa con el grupo amino libre, principalmente el amino terminal de lisina y arginina, sin la participación de enzimas. Es un proceso secuencial en el que se pueden distinguir varias etapas (*Taghavi y cols., 2016*). Inicialmente se produce la asociación del azúcar con la proteína formando un compuesto denominado base de Schiff; la estructura de este compuesto se reordena hacia una forma más estable, denominada producto de Amadori.



Éste posteriormente sufre una serie de complejas transformaciones que conducen a la formación de compuestos dicarbonílicos muy reactivos, tales como el glicoxal y el metilglicoxal, que pueden reaccionar con centros nucleofílicos de las proteínas, dando lugar a un grupo heterogéneo de residuos o aductos unidos a proteínas llamados productos finales de la glicación avanzada (AGEs) (Vistoli y cols., 2013). Otras vías derivadas de la reacción de Maillard llevan también a la producción de AGEs, en muchos casos a través de reacciones de oxidación, por eso en conjunto, la formación de AGEs derivada de la glicación de proteínas recibe el nombre de glicoxidación.



**Figura 1.11. Reacción de Maillard y formación de AGEs.** La glicación no enzimática (productos de Amadori) por reacciones oxidativas da lugar a productos intermedios muy reactivos, capaces de unirse a otras proteínas. El proceso termina con la formación de productos estables AGE. En presencia de metales de transición, la glucosa se autooxida, produciendo radicales libres oxidantes derivados del oxígeno ( $\cdot OH$  = hidroxilo;  $O_2^-$  = anión superóxido),  $H_2O_2$  y cetoaldehídos.

Además de los azúcares reductores, también los lípidos oxidados son capaces de reaccionar con los grupos amino en reacciones tipo Maillard (Baynes y Thorpe, 2000). La descomposición oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados inicia reacciones que desembocan en la formación de varias especies carboniladas reactivas, que al reaccionar con centros nucleofílicos de las proteínas generan productos finales específicos de la lipoxidación avanzada, como malondialdehído-Lys (MDA-Lys), 4-hidroxinonenal-Lys (HNE-Lys) y N<sup>ε</sup>-(hexanil)lisina (Pokorny y cols., 1988).

Otros productos tóxicos que se forman durante las modificaciones no enzimáticas de las proteínas tienen un origen mixto, esto es, pueden formarse a partir de la oxidación de carbohidratos o de lípidos.

Por tanto, debido a las diferentes modificaciones oxidativas que produce el estrés oxidativo en las proteínas existen marcadores de diferentes tipos de lesión; pueden ser indicadores de oxidación *sensu stricto* como semialdehído aminoadípico (AASA) (Fig. 1.12) y semialdehído glutámico (GSA) (Fig. 1.13) (Requena y cols., 2001), marcadores de glicosidación como N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina (CEL) o marcadores mixtos de reacciones de glico y lipoperoxidación como -carboximetil-lisina (CML)(Fu y cols, 1996). CEL es un derivado de la lisina que se forma como producto final de la glicación avanzada durante la reacción de metilglioxal (MGO) con proteínas (Fig. 1.14). CML es un homólogo de CEL y, al igual que éste, es un producto final de glicación avanzada (Fig. 1.15).

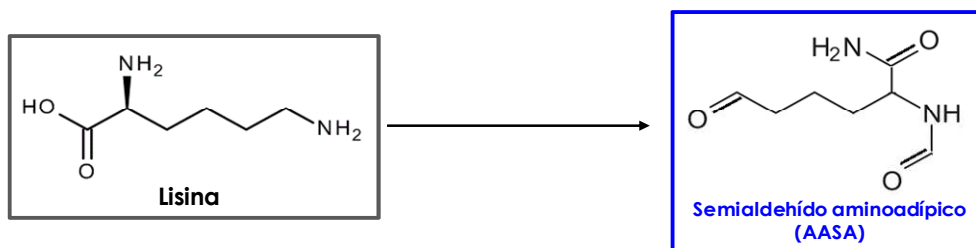


Figura 1.12. Formación de semialdehído aminoadípico a partir del aminoácido lisina.

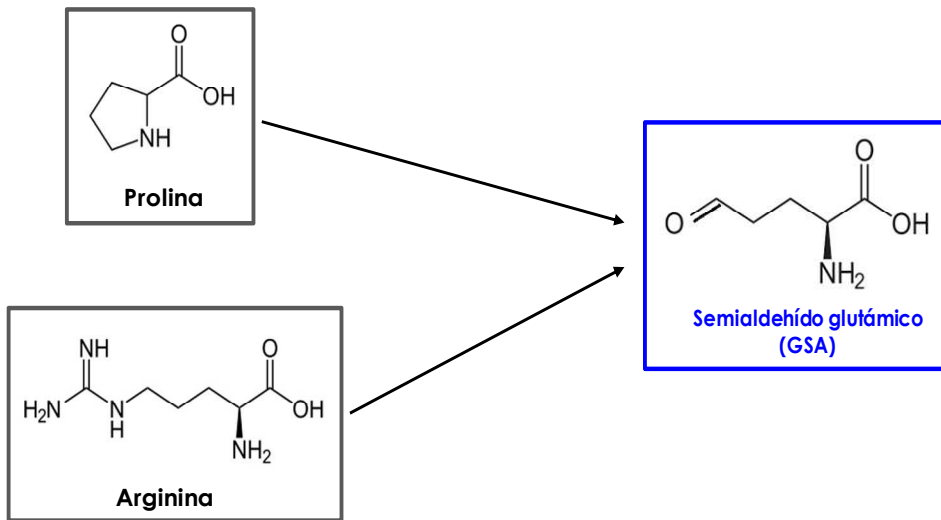


Figura 1.13. Formación de semialdehído glutámico a partir de los aminoácidos prolina y arginina.

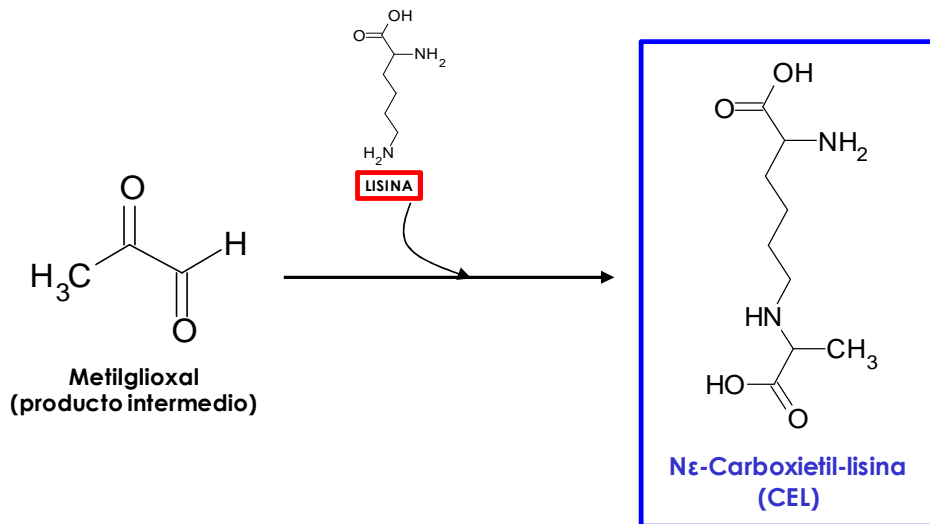


Figura 1.14. Formación de CEL a partir de metilglioxal.

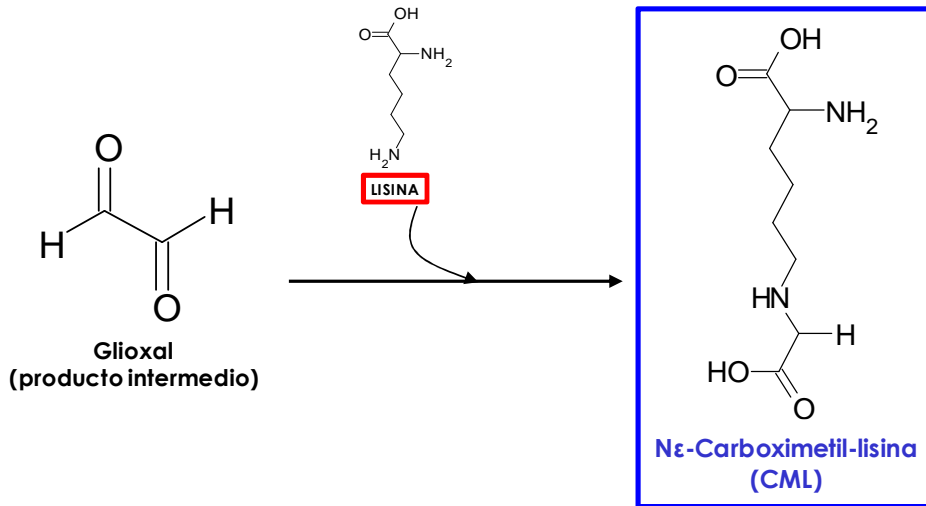


Figura 1.15. Formación de CML a partir de gloixal.

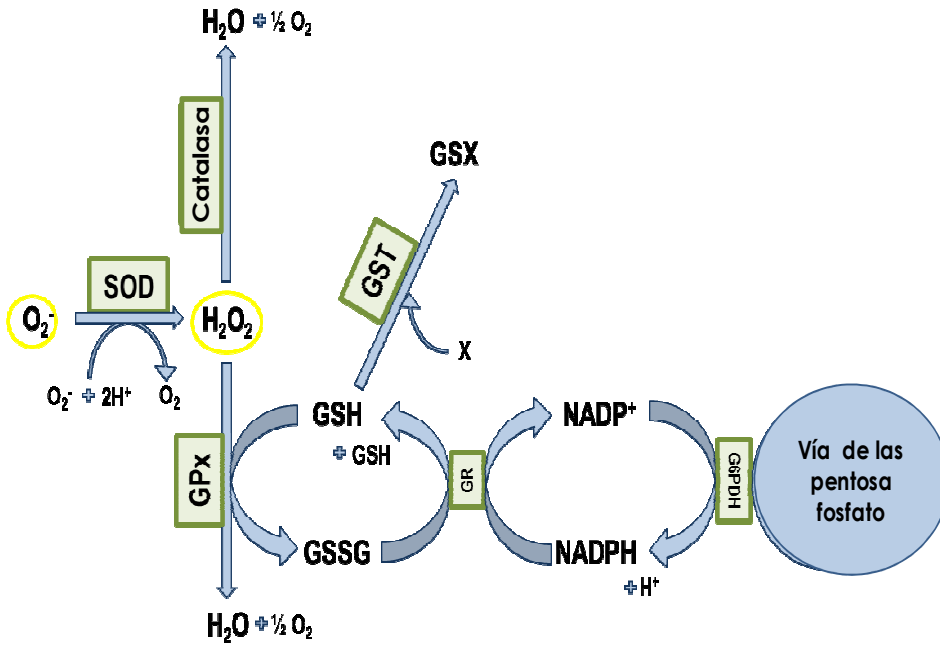
## 1.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Dada la toxicidad de ROS y RNS, las células han desarrollado mecanismos de defensa que retrasan o previenen significativamente la oxidación de los sustratos oxidables como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ADN, y se conocen como sistemas antioxidantes.

Debido a la diversidad de los ROS, los sistemas de defensa también son variados. Según presenten o no actividad catalítica, los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

### 1.4.1 Antioxidantes enzimáticos

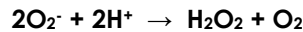
Poseen especificidad de sustrato y catalizan la conversión de ROS en compuestos menos reactivos, deteniendo las reacciones en cadena de la oxidación.



**Figura 1.16. Reacciones en las que participan enzimas antioxidantes en la célula.** SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión; GSSG: disulfuro de glutatión; GST: glutatión S-transferasa; X: xenobiótico; GSX: conjugado de glutatión con xenobiótico; GR: GSSG reductasa; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

### SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Descubierta por McCord y Fridovich (1969), SOD cataliza la reacción de dismutación del  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , el cual puede ser eliminado a su vez por catalasa y glutatión peroxidasa. La reacción global catalizada por SOD es la siguiente:



Se han descrito 3 isoformas de SOD en humanos: Cu,Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial y Cu,Zn-SOD extracelular (EC-SOD) (Fukai y Ushio-Fukai, 2011). Estas enzimas catalizan la misma reacción y operan con un mecanismo similar en el que el metal del centro activo es reducido y oxidado alternativamente por el  $O_2^-$  en etapas sucesivas. En el caso de las Cu,Zn-SOD, el  $Cu^{2+}$  reacciona con  $O_2^-$  abstrayendo su electrón. El Zn tiene un papel estructural.

- **Cu/Zn-SOD** es muy estable frente a los cambios de pH y temperatura, a la proteólisis y a la desnaturalización. Sin embargo, se inactiva con  $\text{CN}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Su peso molecular es de 32 KDa y consta de dos subunidades, cada una de las cuales tiene un centro activo con Cu y Zn.

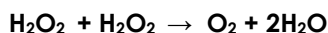
- **Mn-SOD** se encuentra presente en mitocondrias y cloroplastos, lugares donde la formación de  $\text{O}_2^-$  es abundante debido a las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo. Tiene un peso molecular de 23 KDa y es menos estable que las Cu/Zn-SOD, ya que pierde su actividad a temperaturas mayores de  $50^\circ\text{C}$  y a pHs superiores a 8. Es resistente al  $\text{CN}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  y es estable frente a la azida.

- **EC-SOD** es el principal eliminador extracelular de  $\text{O}_2^-$  y el principal regulador de la bioactividad del NO en las paredes de los vasos sanguíneos, riñón y placenta (*Qin y cols., 2008*). Tiene un peso molecular de 135 KDa. Al disminuir los niveles extracelulares de  $\text{O}_2^-$  evita que éste reaccione con el NO formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), por lo que aumenta la vida media del NO.

Cu,Zn-SOD y Mn-SOD se localizan en las células de la granulosa y de la teca en todas las distintas etapas del desarrollo folicular (*Sugino, 2005*). También se expresan en las células del cúmulo oóforo (*Zuelke y cols., 1997*).

### **CATALASA (CAT)**

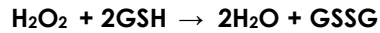
CAT cataliza la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ .



Aunque CAT no es esencial para algunos tipos celulares en condiciones normales, sí tiene un papel en la respuesta adaptativa de la células al estrés oxidativo (*Céspedes Miranda, 1996*).

### **GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)**

GPx comparte su sustrato con CAT, pero además cataliza la reducción de diferentes hidroperóxidos lipídicos y orgánicos utilizando GSH que es transformado en GSSG.



Se han encontrado al menos cinco isoformas de GPx en humanos. La GPx1 o cGPx (citosólica o clásica) reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón e hígado (*Ho y cols., 1997*). La GPx2 (GI-GPx o GPx gastrointestinal) y la GPx3 (pGPx o GPx plasmática o extracelular) se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente (*Maddipati y Marnett, 1987*). La GPx4 (PHGPx o GPx de hidroperóxidos lipídicos) se localiza tanto en la fracción citosólica como en la membrana. GPx4 puede reducir directamente los hidroperóxidos de los fosfolípidos, peróxidos de ácidos grasos e hidroperóxidos de colesterol, que se producen en las membranas peroxidadas y en las lipoproteínas oxidadas (*Hansen y Deguchi, 1996*). Y por último la GPx5 (o GPx de epidídimo) se expresa únicamente en epidídimo de mamíferos (*Perry y cols., 1992*) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Características de los miembros de la familia de GPx {{539 Drevet,Joël R. 2006;}}.

		GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5
<b>Grado de expresión</b>	<b>Alto</b>	Pulmón, riñón	Estómago, intestino	Riñón, pulmón	Testículos, espermatozoide	Epidídimo, espermatozoide
	<b>Medio</b>	Eritrocitos, hígado		Epidídimo vasos deferentes, vesícula seminal, placenta, corazón, músculo		Hígado, riñón
	<b>Bajo</b>	Cualquier tejido		Cualquier tejido	Corazón, cerebro	
<b>Localización celular</b>		Citosol, mitocondria	Citosol	Secretada, citosólica	Asociada a membrana, núcleo	Secretada, asociada a membrana
<b>Peso molecular (KDa)</b>		21	22	22,5	19	24
<b>Polimerización</b>		Tetramero	Tetramero	Tetramero	Monómero	Dímero
<b>Número de residuos</b>		198-201	190	203(+22)	158	201(+20)
<b>Residuo selenocisteína</b>		Si	Si	Si	Si	No
<b>Primera referencia</b>		(Mills, 1957)	(Chu y cols., 1993)	(Takahashi y cols., 1987)	(Ursini y cols., 1982)	(Ghyselinck y Dufaure, 1990)



### **GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)**

Cataliza la conjugación de GSH con un centro electrofílico de una molécula pequeña. De esta manera ejerce un papel protector contra la toxicidad causada por xenobióticos y sus metabolitos. Los derivados conjugados del GSH son por lo general biológicamente inactivos y no tóxicos, y son rápidamente excretados por el organismo tras su conversión metabólica en derivados del ácido mercaptúrico (*Pastore y cols., 2003*).

Las distintas GST están agrupadas en dos grandes familias génicas que codifican para GSTs solubles o citosólicos y para GSTs de membrana (*Hayes y cols., 2005*). Existen 4 clases de GST originadas a partir de la combinación de dímeros de diferentes subunidades (*Habig y cols., 1974*): tres GST citosólicas ( $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\pi$ ) y una GST unida a la membrana, conocida como GST microsómica (*Morgenstern y cols., 1980*). Se han descrito varios tipos de GST solubles y se ha visto que tienen, además de actividad glutatión S-transferasa, actividades peroxidasa e isomerasa (*Maeda y cols., 2005*).

### **PARAOXONASAS (PONS)**

La familia de las paraoxonasas se compone de tres miembros que son homólogos estructurales: PON1, PON2 y PON3, cuyos genes se encuentran situados de forma adyacente en el brazo largo del cromosoma 7 en los seres humanos (*Primo-Parmo y cols., 1996; Aviram y cols., 2004*), y comparten un 70% de identidad en sus secuencias. Las proteínas PON1, PON2 y PON3 tienen un peso molecular de aproximadamente 40 kDa y están formadas por 355 aminoácidos.

En humanos PON se expresa en diferentes tejidos; PON1 y PON3 se expresan fundamentalmente en el hígado, desde donde son liberadas a la circulación para permanecer unidas a partículas de HDL, mientras que PON2 se expresa en múltiples tejidos. PON2 es una proteína intracelular, donde se encuentra unida a la membrana nuclear y del retículo endoplasmático. Inicialmente se consideraba que las paraoxonasas eran enzimas que hidrolizaban y neutralizaban compuestos organofosforados como el insecticida paraoxón y

diversos gases nerviosos (Costa y cols., 2003; Richter y cols., 2009). Estudios posteriores demostraron que PON1 también posee actividad lactonasa (Tougou y cols., 1998) y, lo que es más importante, es capaz de degradar lípidos oxidados en las lipoproteínas y la forma tiolactona de la homocisteína, intermediario que puede inducir modificaciones proteicas, lo que le confiere un papel en la protección frente a enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis (Draganov, 2007; Negre-Salvayre y cols., 2006). Al igual que PON1, PON2 y PON3 son capaces de hidrolizar lactonas pero carecen de actividad paraoxonasa.

Aunque aún no se conoce exactamente cuáles son los sustratos biológicos de PON, para estudiar sus actividades *in vitro* se usan diferentes sustratos sintéticos; así, para determinar la actividad PON1 los principales sustratos utilizados son paraoxón (actividad paraoxonasa) y fenilacetato (actividad arilesterasa). Para PON2 se utiliza metilparaoxón (actividad metilparaoxonasa) y en el caso de la actividad PON3 se utilizan lactonas (actividad lactonasa).

**PON1.** Su actividad es dependiente de calcio. Es responsable de la defensa ejercida por las HDL frente a las modificaciones oxidativas de las LDL.

La clonación del gen en 1993 permitió la identificación de más de 200 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en diferentes regiones del gen, destacando los de la región codificante en las posiciones 192 y 55 y en la región promotora 108. La sustitución de glutamina (Q) por arginina (R) en el codón 192 determina diferente actividad hidrolasa frente a varios sustratos. El alelo Q es menos eficiente que el R para hidrolizar paraoxón pero más eficiente frente a las lipoproteínas oxidadas. La modificación del nucleótido 192 no afecta a la capacidad de hidrólisis del fenilacetato. La sustitución de leucina (L) por metionina (M) en la posición 55 es determinante de diferentes concentraciones séricas de la proteína PON1, estando asociado el alelo M con concentraciones más bajas (Adkins y cols., 1993; Durrington y cols., 2001).

**PON2.** Al igual que PON1 aunque en menor grado, PON2 desempeña gracias a sus actividades lactonasa y esterasa un papel antioxidante, pero en este caso intracelular, debido a su localización unida a diversos orgánulos

intracelulares. De forma similar a PON1 sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias ayudan a prevenir el proceso aterosclerótico

**PON3.** El gen *PON3* está situado entre *PON1* y *PON2* en el grupo de genes de esta familia y es el menos estudiado en comparación con los otros dos.

Al igual que PON1, la proteína PON3 es sintetizada en el hígado y posteriormente secretada a la circulación donde se encuentra asociada a las HDL, aunque en la sangre humana predomina PON1. Diferentes estudios han demostrado que PON3 se asocia a fracciones nucleares, mitocondriales y del retículo endoplasmático (Schweikert y cols., 2012). También presenta propiedades antioxidantes y protege o revierte la oxidación de LDL con más eficacia que PON1 (Ng y cols., 2005; Draganov, 2007).

## 1.4.2 Antioxidantes no enzimáticos

Las sustancias antioxidantes pueden prevenir la formación de radicales libres, como por ejemplo los quelantes de metales de transición que evitan la formación del radical hidroxilo, o bien detener las reacciones en cadena de la peroxidación, proporcionando un electrón a un radical libre, con la consiguiente formación de un producto estable. Entre estos antioxidantes se hallan las vitaminas C y E y el GSH.

### VITAMINA E

La vitamina E pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ampliamente distribuidas en los alimentos de origen vegetal. Consta de 2 partes: un anillo complejo de cromano y una larga cadena lateral de fitilo. Existen cuatro formas de la vitamina E: alfa, beta, gamma y delta-tocoferol, y cada una de ellas contiene a su vez 8 isómeros, siendo el RRR- $\alpha$ -tocoferol la forma más activa de la vitamina E en humanos y un poderoso antioxidante biológico.

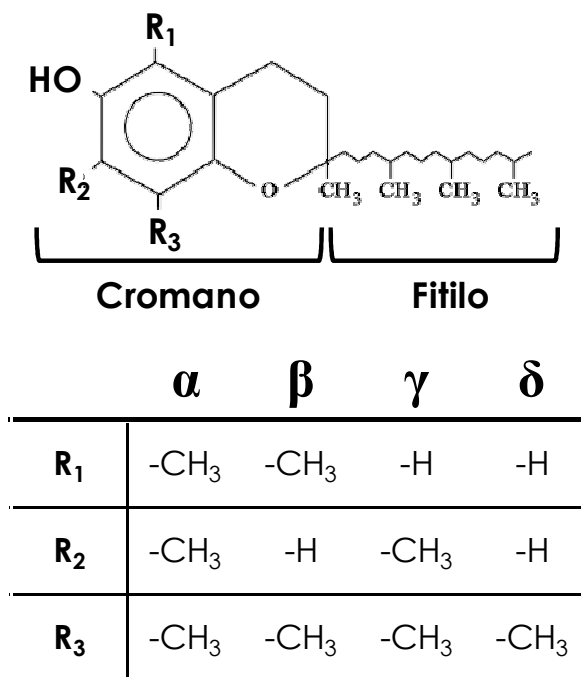


Figura 1.17. Estructura química básica de la vitamina E.

La vitamina E está localizada en las membranas celulares y lipoproteínas, donde reacciona con radicales diversos, principalmente con los radicales peroxilo que propagan la oxidación en cadena de los ácidos grasos poliinsaturados. Este antioxidante cede un H del grupo OH de la cabeza de cromano al radical peroxilo, que se transforma en un compuesto no radicalario y el tocoferol en radical tocoferoxilo, de vida media larga y, por tanto, menos reactivo (Fig. 1.18).

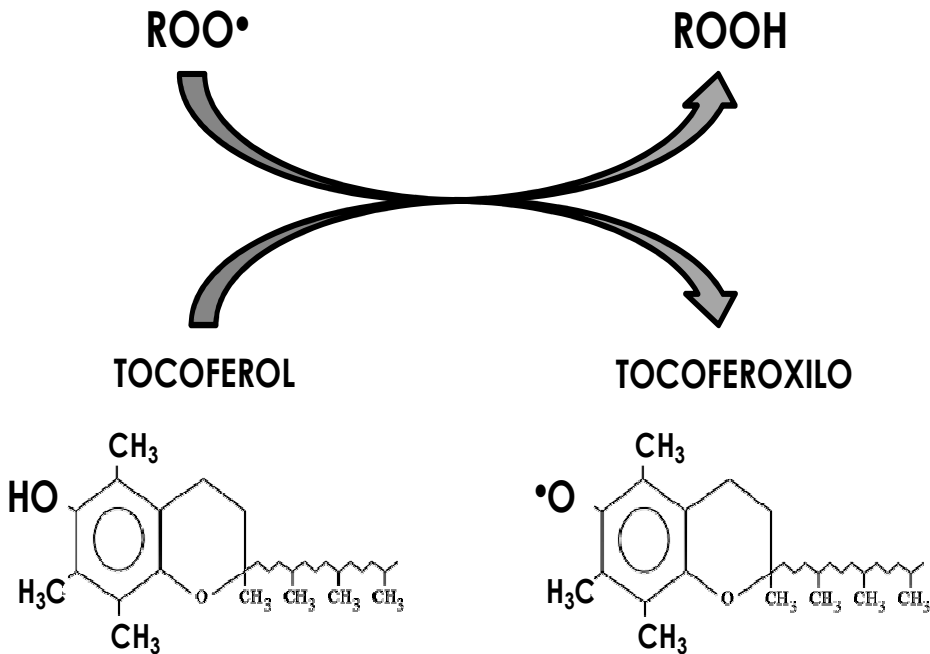


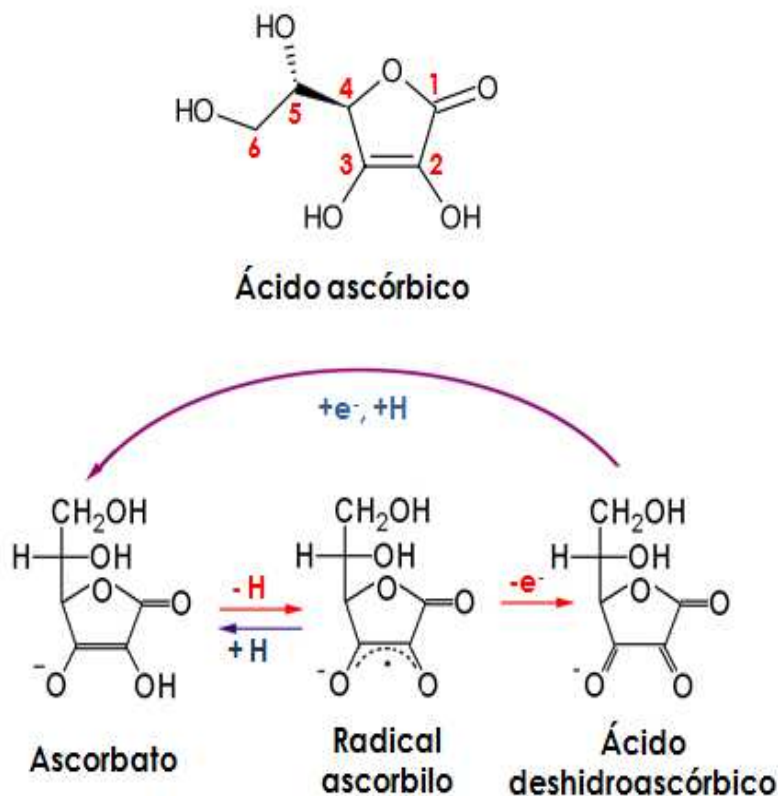
Figura 1.18. Reacción del  $\alpha$ -tocopherol.

### VITAMINA C

La vitamina C o ácido ascórbico es un sólido cristalino blanco muy soluble en agua. El ácido ascórbico en plantas y algunos animales es sintetizado a partir de la glucosa, pero los humanos no lo sintetizan. Por ello es necesario ingerirla en la dieta (*Halliwel y Gutteridge, 1990*).

El ácido ascórbico tiene estructura de lactona. La acidez no se debe al grupo carboxílico, sino a la posibilidad de que se ionice el hidroxilo situado sobre el carbono 3, formando un anión que queda estabilizado por resonancia.

En el citosol la vitamina C actúa como un antioxidante primario que elimina ROS producidas en el metabolismo celular. La vitamina C favorece el reciclado de la vitamina E (*Chan, 1993*).



**Figura 1.19. Estructura química y reacciones redox del ácido ascórbico.** El ascorbato es oxidado en dos etapas en las que pierde cada vez un electrón, pasando por una forma ascorbilo de radical libre. Este intermediario es seguidamente oxidado a ácido deshidroascórbico.

### **GLUTATIÓN (GSH)**

El GSH es un tripéptido formado por L-cisteína, L-glutamato y L-glicina ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly). Además de participar en reacciones de conjugación catalizadas por GST para la eliminación de xenobioticos, el GSH es el principal antioxidante intracelular. El glutatión está presente en las células tanto en su forma reducida como oxidada.

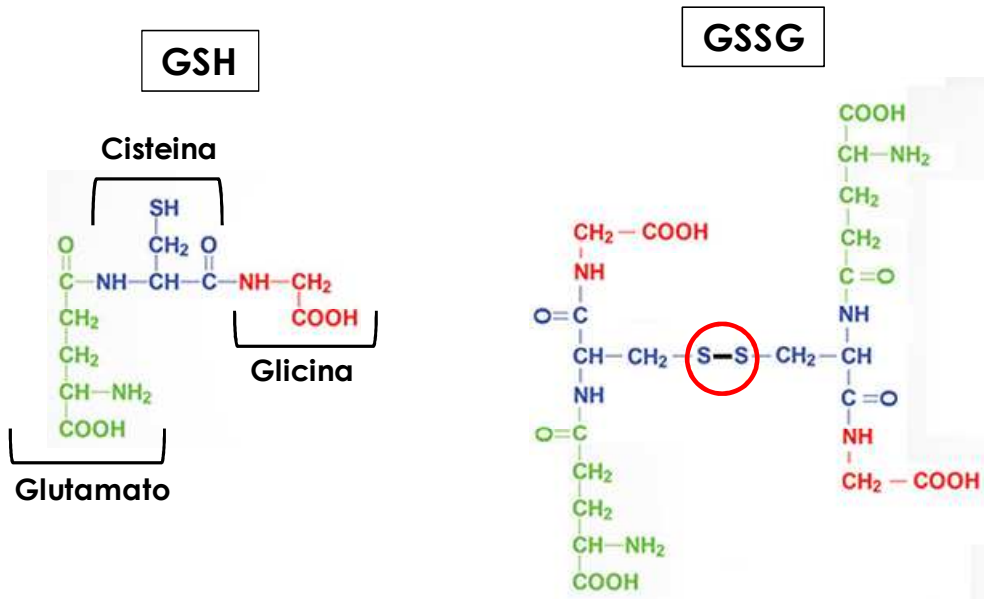


Figura 1.20. Estructura química de las dos formas reducida y oxidada del glutati6n.

Como se ha comentado anteriormente, el GSH se utiliza en la eliminaci6n de ROS por reacciones catalizadas por el enzima GPx. GSH dona un hidr6geno y se convierte en GSSG. El GSSG se reduce a GSH por la enzima GSSG reductasa, que utiliza NADPH como donador de electrones, que procede de la ruta de las pentosas fosfato. En las c6lulas sanas m6s del 90% del glutati6n se encuentra como GSH. Una disminuci6n del cociente GSH/GSSG es indicativo de estr6s oxidativo.

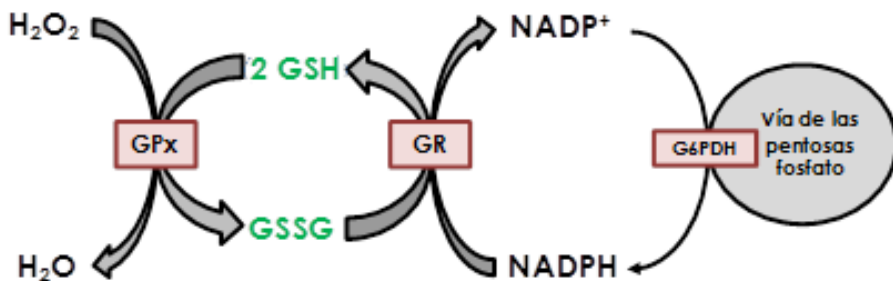


Figura 1.21. Ciclo redox de GSH/GSSG. GPx: glutati6n peroxidasa; GSH: glutati6n; GSSG: disulfuro de glutati6n; GR: GSSG reductasa; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

## 1.5 ROS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Con respecto a la fisiología de la reproducción en la mujer, los ROS y los sistemas antioxidantes desempeñan diferentes funciones (Kato y cols., 1997; Sugino, 2005; Agarwal y cols., 2008). En concentraciones adecuadas se comportan como mediadores de la señalización hormonal, la esteroidogénesis ovárica, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la luteolisis, así como de la función de las células germinales.

ROS se forman periódicamente dentro del ovario a consecuencia de procesos como la síntesis de hormonas esteroideas durante las fases folicular y lútea (Gonzalez-Fernandez y cols., 2005). Otra fuente de ROS la constituye el elevado número de neutrófilos y macrófagos existente en los folículos y en el cuerpo lúteo.

Diversos estudios han demostrado la relación existente entre ROS del líquido folicular, la foliculogénesis y la esteroidogénesis (Sugino y cols., 2004). Durante el desarrollo folicular se produce una disminución del aporte de oxígeno a las células, la hipoxia en las células de la granulosa induce angiogénesis folicular necesaria para el crecimiento y desarrollo del folículo, y su impedimento, en cambio, contribuye a la atresia folicular. La hipoxia modula la producción de ROS que actúan como mensajeros intracelulares de esta respuesta angiogénica (Basini y cols., 2004).

La transición desde el folículo en desarrollo hasta el folículo antral se asocia a un marcado aumento del metabolismo de las células de la granulosa, fundamentalmente en la producción de esteroides vía citocromo P450 (Richards, 1994), con el consiguiente aumento de la generación de radicales libres. En ratas se han observado cambios cíclicos en los niveles de SOD asociados al ciclo reproductivo (Laloraya y cols., 1988). Esta actividad se encuentra en los diferentes estadios foliculares, así como en las células del cúmulo que rodean al ovocito y en el líquido folicular (Zuelke y cols., 1997). Las gonadotropinas aumentan la expresión de Mn-SOD y de EC-SOD en folículos de ratas (Tilly y Tilly, 1995).



El  $O_2^-$  puede dar lugar a la ruptura de la pared folicular, requisito indispensable para la ovulación; de hecho, se ha observado que la peroxidación lipídica se intensifica en el folículo preovulatorio [{{199 Jozwik 1999;}}](#). El mecanismo de la ovulación se ha comparado con un proceso de inflamación aguda con producción de prostanoïdes y leucotrienos. La inflamación que acompaña al proceso de ovulación se caracteriza por un aumento en la producción de prostaglandinas y citoquinas, activación de metaloproteïnasa y de la permeabilidad vascular. Todas estas reacciones inflamatorias relacionadas con la ruptura del folículo están mediadas por ROS. La estricta relación que existe entre ROS, apoptosis y ovulación se ha confirmado por diferentes estudios [{{924 Sato,Eisuke F. 1992;}}](#) [{{925 Miyamoto,Kaori 2010;}}](#) [{{377 Shkolnik 2011;}}](#).

ROS intervienen en la maduración del ovocito, dado que inducen la reanudación de la meiosis I en la pubertad [{{366 Behrman 2001;}}](#).

En nuestro grupo de investigación se ha descrito que los tratamientos de estimulación ovárica conducentes a la obtención de ovocitos para la FIV conllevan una disminución de la resistencia a la oxidación *in vitro* del suero, es decir, provocan un aumento del estado oxidado del suero, y que, además, el aumento de la velocidad de oxidación del suero se correlaciona positivamente con la obtención de embarazo en la FIVTE [{{190 Aurrekoetxea 2010;}}](#).

Además de las funciones fisiológicas ejercidas por ROS durante la ovulación, hay que tener en cuenta sus efectos adversos a concentraciones altas [{{306 Al 2010;}}](#). Los ROS puede estar aumentados en el microambiente del ovocito [{{380 Guerin,P. 2001;}}](#), pudiendo inhibir el desarrollo del mismo [{{381 Tatemoto,H. 2000;}}](#), causar detención de la meiosis, un aumento del número de ovocitos "degenerados" [{{381 Tatemoto 2000;}}](#) e inducir apoptosis del cigoto [{{926 Liu,L. 2000;}}](#).

Para preservar al ovocito del daño oxidativo, mantener la calidad ovocitaria y asegurar la reproducción, las células foliculares ováricas disponen de una serie de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos presentes en los folículos en desarrollo.

Puesto que el líquido folicular es el entorno que rodea directamente el ovocito, tiene un impacto directo sobre el crecimiento y la maduración del mismo (*Irving-Rodgers y cols., 2010; Revelli y cols., 2009; Rodgers y Irving-Rodgers, 2010*). Por todo ello, un líquido folicular en el que persiste una situación de estrés oxidativo puede dar lugar a una disminución de la calidad del ovocito, con lo que queda afectado el resto de etapas del proceso reproductivo (*Eaton, 2006*). Los diferentes compuestos antioxidantes presentes en el líquido folicular pueden moderar la acción de los radicales libres, limitando así el daño oxidativo.

El cuerpo lúteo se forma después de la ovulación y es responsable de la producción de progesterona necesaria para el establecimiento y el mantenimiento del embarazo. Esta síntesis esteroidea da lugar a producción de ROS, que a su vez, ROS ejercen un efecto sobre la producción de progesterona (*Sugino 2006*), como se ha visto en estudios *in vitro*. En la fase lútea, aumentan las defensas antioxidantes para preservar la integridad del cuerpo lúteo (*Sugino 2006; Jones y cols., 2008*). Así, según *Rizzo y cols. (2009)* el descenso en la concentración de ROS producido en la fase lútea con respecto a la fase folicular puede ser debido al efecto antioxidante ejercido por la alta concentración de progesterona y a un aumento en la actividad Cu/Zn-SOD así como a mayores concentraciones de ascórbico.

Por otro lado, la disminución de la actividad SOD y el aumento de ROS ejercen efectos luteolíticos. La concentración de ROS en el cuerpo lúteo aumenta durante la fase de regresión y esto estimula la síntesis de prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . También se ha observado que la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  induce apoptosis al aumentar la producción de ROS en células luteas de rata y que los antioxidantes, en cambio, inhiben la apoptosis. Los ROS parecen, por tanto, inducir la muerte celular por apoptosis durante la luteolisis (*Sugino y cols., 2002*). Por otro lado, diversos estudios sugieren que las actividades antioxidantes protegen al cuerpo lúteo del daño oxidativo y la apoptosis y pueden desempeñar un papel importante para evitar la involución lútea cuando se produce el embarazo, como parece reflejar el aumento de las actividades catalasa, SOD, GPx y GST en el cuerpo lúteo en diversas especies al inicio de la gestación (*Sugino y cols., 1993; Al-Gubory y cols., 2004*).

Las células del endometrio generan ROS en su metabolismo. También la placenta es productora de ROS. Puesto que tanto las células germinales como los embriones son vulnerables a los efectos dañinos de ROS, un aumento en la producción de los mismos, como ocurre durante el embarazo, puede tener efectos deletéreos sobre el proceso reproductivo (*Jauniaux y cols., 2003*).

Nuestro grupo ha descrito que el polimorfismo Ala/Val SOD2, que codifica para la forma mitocondrial de SOD o MnSOD, se asocia con la tasa de embarazo en la FIVTE. En particular el genotipo Ala/Ala SOD2, de alta actividad, es un predictor independiente y significativo de embarazo, lo que refleja el papel de la defensa antioxidante, en particular en la mitocondria, para poder concebir en la FIVTE (*Ruiz-Sanz y cols., 2011*).

El estrés oxidativo durante el desarrollo inicial de la placenta se asocia a diversas patologías, como la reabsorción del embrión, abortos, la restricción del crecimiento intrauterino y la preeclampsia (*Myatt y Cui, 2004*). Por eso, una adecuada defensa antioxidante placentaria es indispensable para prevenir complicaciones en la madre y en el feto.

En conclusión, ROS puede afectar a una variedad de funciones fisiológicas en el proceso reproductivo, y en altas concentraciones puede dar lugar a patologías que afectan a la reproducción femenina.









## *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*







## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se estima que en España 55.000 parejas se incorporan cada año al colectivo con problemas de fertilidad que acuden a las técnicas de reproducción asistida como medida terapéutica. Una de las fases iniciales de las técnicas de reproducción asistida consiste en someter a la mujer a un ciclo de estimulación ovárica controlada para poder obtener un número elevado de ovocitos viables para ser posteriormente fecundados mediante los procedimientos más apropiados en cada caso. Estos tratamientos suponen para la mujer un estrés psicológico añadido a las repercusiones físicas del tratamiento, siendo frecuente la aparición de emociones negativas como la ansiedad y la frustración. Es, por tanto, fundamental que los tratamientos sean efectivos. En este contexto se enmarca este proyecto de tesis doctoral, es decir, en la búsqueda de biomarcadores de disfunción y de fertilidad que permitan mejorar a medio/largo plazo las técnicas de reproducción asistida.

Los antioxidantes y las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) a concentraciones fisiológicas están implicados en la regulación del sistema reproductor de la mujer (desarrollo folicular, ovulación, ciclo lúteo, fertilización del ovocito, embriogénesis). Pequeñas variaciones en el equilibrio redox pueden desencadenar señalización mediada por ROS, que regula estos procesos. Sin embargo, a concentraciones elevadas ROS y RNS provocan daño a macromoléculas y conducen a una situación de *estrés oxidativo* que se asocia a patologías y complicaciones obstétricas. Para concebir es necesario el control riguroso de los componentes de la balanza prooxidantes *versus* antioxidantes, de forma que se hallen en un *equilibrio redox*.

El líquido folicular constituye el microambiente del ovocito *in vivo*, y aporta nutrientes y moléculas reguladoras durante el desarrollo y la maduración ovocitaria. El líquido folicular es en parte un exudado del suero, ya que las proteínas y lipoproteínas pequeñas del suero pueden difundir libremente a través de la barrera folicular, pero también contiene sustancias producidas

localmente por las células del folículo. Poco se conoce sobre el estado antioxidante del líquido folicular y de cómo éste afecta a la calidad ovocitaria.

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

Los **OBJETIVOS** de este proyecto de tesis doctoral son caracterizar el estado antioxidante del líquido folicular de folículos A) en distinto grado de maduración (pequeños y grandes), y B) de mujeres fértiles y subfértiles, sometidas a un ciclo de estimulación ovárica controlada, de forma que a partir de los resultados puedan establecerse biomarcadores de maduración folicular y de fertilidad.

Para llevar a cabo los OBJETIVOS propuestos se va a utilizar una población de mujeres distribuidas en dos grupos: A) mujeres fértiles, donantes de óvulos con al menos un hijo vivo (Donantes) y B) mujeres subfértiles, pacientes que entran en un programa de reproducción asistida (Pacientes). De cada mujer se obtiene líquido folicular de folículos pequeños (diámetro <12 mm) y grandes (diámetro  $\geq$  18 mm).

Se van a realizar los siguientes OBJETIVOS OPERATIVOS:

1. Determinar en el líquido folicular parámetros bioquímicos y marcadores del estado antioxidante del fluido, en particular, actividad antioxidante total (TAA y ORAC), niveles de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y óxido nítrico, y actividades de enzimas antioxidantes (SOD, catalasa, GPx, GST y del sistema de las paraoxonasas). Se van a comparar estos parámetros entre folículos pequeños y grandes para cada mujer y entre los dos grupos poblacionales.

2. Analizar en el líquido folicular la expresión, mediante transferencia Western, de las proteínas de la familia de paraoxonasas: PON1, PON2 y PON3.

3. Desarrollar una metodología para determinar biomarcadores de las modificaciones oxidativas no enzimáticas de las proteínas del líquido folicular,

en concreto semialdehído glutámico, semialdehído aminoadípico, carboxietil-lisina y carboximetil-lisina, y analizar estas modificaciones en muestras procedentes de Donantes y Pacientes.

4. Establecer para cada ciclo de estimulación ovárica las posibles asociaciones entre los parámetros bioquímicos y del estado antioxidante del líquido folicular, tanto de Donantes como de Pacientes, con los parámetros de fertilidad (número de folículos antrales, de ovocitos totales y maduros y tasa de fertilización), y en el grupo de Pacientes comparar dichos parámetros entre ciclos productivos y no productivos.







## *MATERIALES Y MÉTODOS*











## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Se trata de un estudio prospectivo transversal de casos y controles en el que han participado un total de 193 mujeres reclutadas (desde 2011 hasta 2013) en la clínica de reproducción asistida Instituto Valenciano de Infertilidad en Bilbao ([www.ivi.es](http://www.ivi.es), Vizcaya). Las mujeres se distribuyeron en dos grupos:

A) Grupo control, formado por mujeres con fertilidad probada (al menos un recién nacido vivo), que entran en el Programa de Donación de Óvulos de la clínica (Donantes, N = 86).

B) Grupo de estudio, formado por mujeres con problemas de fertilidad que entran en la clínica para ser sometidas a un tratamiento de fertilidad (Pacientes, N = 107).

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Los criterios de inclusión para la participación en el estudio fueron: 1) no tomar ningún suplemento vitamínico, 2) no haberse sometido a terapia hormonal durante los últimos 12 meses, 3) carecer de problemas cardiovasculares, 4) ausencia de trastorno hipertensivo y de enfermedad metabólica, 5) no tener endometriosis y 6) no tener síndrome de ovario poliquístico (PCOS).

En el grupo de Donantes los criterios de inclusión incluyeron: edad entre 18 y 35 años, índice de masa corporal normal y ciclos menstruales regulares de 26-35 días, siendo los principales criterios de exclusión: cariotipo anormal y abortos de repetición.

#### **TRATAMIENTO**

Las mujeres se sometieron a un ciclo de estimulación ovárica con gonadotropina, según protocolo de la clínica (Soares y cols., 2005). Solo se

incluyó un ciclo para cada paciente. El tratamiento se describe brevemente a continuación.

A partir de la fase lútea media del ciclo precedente (día 20 de ese ciclo) se administra por vía subcutánea acetato de leuprolide, un agonista de la GnRH, (0,5 mg/día) (Procrin®; Abbott, Madrid, España). Para evaluar la maduración folicular se realizan de forma rutinaria ecografías transvaginales y se determinan los niveles de estradiol sérico. Una vez lograda la supresión ovárica, definida como nivel de estradiol sérico < 40 pg/ml y un tamaño folicular < 10 mm de diámetro, se administra FSH recombinante (Gonal F, Merk Serono, Madrid, España) o hMG (gonadotropina menopáusica humana) altamente purificada (Menopur, Ferring, Madrid, España). Para evaluar la maduración folicular y ajustar las dosis se realizan de forma rutinaria ecografías transvaginales y se determinan los niveles de estradiol sérico. Cuando se observan 3 o más folículos de un diámetro  $\geq 18$  mm se administra gonadotropina coriónica humana recombinante (6500 UI) (hCG; Ovitrelle, Merk Serono, Madrid, España) para inducir la ovulación. A las 36 h después de la administración de hCG se realiza la punción folicular transvaginal guiada por ultrasonido.

#### **COMPILACIÓN DE LA INFORMACIÓN CLÍNICA Y SEGUIMIENTO**

Toda la información clínica se recoge en la Clínica de Reproducción asistida IVI-Bilbao. Esta información es necesaria para poder realizar el seguimiento de las pacientes y está amparada por los correspondientes Sistemas de Protección de Datos de la Clínica.

#### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Los Comités de Ética de la UPV/EHU (CEISH, Comité de Ética para la Investigación con Seres Humanos y CEIAB, Comité de Ética para la Investigación con Agentes Biológicos) aprobaron los protocolos del proyecto (CEISH/96/2011/RUIZLARREA y CEISH/125/2012/RUIZ LARREA). El estudio se realizó de acuerdo con los convenios entre la UPV/EHU y el IVI-Bilbao (Ref. RUIZ LARREA-IVI 2012/01 y 2012/02). El proyecto cumple con la Ley Española de Tecnologías de Reproducción Asistida (14/2006). De todas las mujeres que participaron en el estudio se obtuvo el consentimiento informado por escrito.

### **RECOGIDA DE LA MUESTRA**

Las muestras de líquido folicular (LF) se obtienen de folículos de dos tamaños diferentes; folículos pequeños (diámetro <12 mm) y folículos grandes (diámetro  $\geq 17$  mm). La obtención de las muestras se realiza mediante la punción folicular. A continuación se aspira individualmente el LF de un par de folículos contralaterales para cada tamaño. Se comprueba visualmente que las muestras no estén contaminadas con sangre, desechándose aquellas muestras contaminadas. Inmediatamente después de la separación del ovocito del LF, se mezclan las 2 muestras de LF procedentes de folículos del mismo tamaño y se centrifugan a 3000 x g durante 10 min para eliminar los desechos celulares. El sobrenadante (LF) se transfiere a tubos de polipropileno estériles y se almacena en nitrógeno líquido. Se mantiene la cadena de frío hasta que los tubos son almacenados a -80 °C para su posterior análisis en la Universidad del País Vasco por el grupo de investigación de radicales libres y estrés oxidativo (FROS) ([www.ehu.eus/radicaleslibres/](http://www.ehu.eus/radicaleslibres/)).

## **3.2 VARIABLES DEL ESTUDIO**

A continuación se describen las variables analizadas para este estudio.

### **VARIABLES RECOGIDAS DE LA HISTORIA CLÍNICA**

Se recogió información sobre la edad, el índice de masa corporal (IMC) y hábito tabáquico. Las variables de infertilidad se definieron como de origen femenino, masculino o desconocido.

Las causas de infertilidad de origen femenino fueron: aborto de repetición, factor genético, factor tubárico, baja respuesta, edad y daño iatrogénico.

Las causas de infertilidad de origen masculino se refirieron a problemas relacionados específicamente con los espermatozoides o el líquido seminal.

### **VARIABLES DE FERTILIDAD**

Tras un ciclo de estimulación ovárica se recogieron ovocitos, que fueron fertilizados *in vitro* mediante inyección intracitoplasmática (ICSI) o mixta (FIV/ICSI)(FIV: Fertilización *In Vitro*). En ambas poblaciones (Donantes y Pacientes) se determinó el número de folículos antrales, ovocitos totales y maduros y la tasa de fertilización. En las Pacientes en las que se llevó a cabo la transferencia embrionaria se determinó la tasa de implantación y el % de ciclos productivos (% de mujeres que se embarazan).

### **VARIABLES DERIVADAS DEL ANÁLISIS DEL LF**

En el LF se han determinado parámetros bioquímicos (albumina, ácido úrico, apo-AI, colesterol total, glucosa, HDLc, proteínas totales y triglicéridos), actividades antioxidantes totales (TAC y ORAC), niveles de las vitaminas antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol y de óxido nítrico, y las actividades enzimáticas: catalasa, glutatión peroxidasa total y dependiente de selenio, glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa, PON1 arilesterasa, PON1 paraoxonasa, PON2 metilparaoxonasa y PON3 simvastatinasa. También se han cuantificado las proteínas: PON1, PON2 y PON3.

Finalmente se determinaron los biomarcadores de las modificaciones oxidativas proteicas: semialdehído glutámico (GSA), semialdehído adípico (AASA), N<sup>ε</sup>-carboxietil-lisina (CEL) y N<sup>ε</sup>-carboximetil-lisina (CML).

## **3.3 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS**

La determinación de los parámetros bioquímicos (albumina, ácido úrico, apo-AI, colesterol total, glucosa, HDLc, proteínas totales y TG) se realizó mediante métodos colorimétricos en un autoanalizador Hitachi 911 en el laboratorio de análisis del Dr. Manuel Lafita.

### 3.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (TAC)

La técnica desarrollada para medir TAC en el LF se fundamenta en la capacidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en la muestra de reducir la especie oxidante: el radical ABTS<sup>+</sup> adicionada al sistema de ensayo.

Se realiza por el método colorimétrico descrito por Re y cols. (1999) modificado como se describe en Aurrekoetxea y cols.(2010).

La disolución del radical ABTS<sup>+</sup> se prepara haciendo reaccionar ABTS (2 mM) con K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 70 mM en H<sub>2</sub>O milliQ en una proporción K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>/ABTS de 1:100 durante 12 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Para el ensayo colorimétrico se diluye 25 veces esta disolución en H<sub>2</sub>O milliQ hasta que la absorbancia a 734 nm sea igual a  $0,70 \pm 0,01$ .

Se estudia la decoloración del radical ABTS<sup>+</sup> en presencia de LF a una temperatura de 30 °C.

El ensayo se realiza en una cubeta en un espectrofotómetro UV-visible (CARY 100 Bio). La reacción se inicia al añadir 1 ml de la disolución de ABTS<sup>+</sup> sobre 2-8 µl de LF, siendo el volumen final 1010 µl. Se registra la absorbancia a 734 nm durante 12,5 min, realizándose medidas cada minuto. Los ensayos se realizan por duplicado, utilizándose como blanco H<sub>2</sub>O milliQ.

Se representa la absorbancia frente al tiempo, calculándose el área bajo la curva (Fig. 3.1). En cada experimento se construye una recta patrón con concentraciones crecientes de Trolox (0-2 mM) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La TAC se expresa en equivalentes de Trolox (mM).

El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método de determinación de la capacidad antioxidante total fue 1,0 y 2,0, respectivamente.



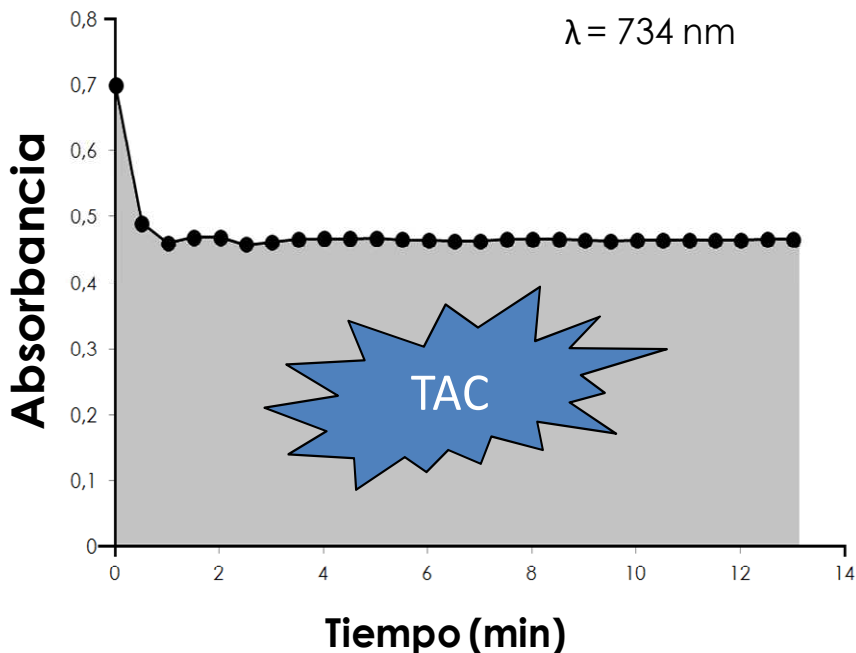


Figura 3.1. Representación grafica de la determinación de la TAC.

### 3.5 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE RADICALES DE OXÍGENO (ORAC)

La determinación de ORAC se basa en el método descrito por Cao y cols. (1993). La técnica mide la degradación de la molécula fluorescente fluoresceína al reaccionar con dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano (AAPH), un compuesto azoderivado. El AAPH genera radicales peroxilo por calentamiento; de esta manera se degrada la fluoresceína, dando lugar a un producto no fluorescente. Los antioxidantes que contiene el LF protegen a la molécula fluorescente frente a la degradación.

El ensayo se realiza fluorimétricamente en un lector de placas Bio-tek Synergy HT a 37 °C. El volumen final de reacción es 200  $\mu\text{l}$  y contiene fluoresceína ( $6,12 \times 10^{-5} \text{ mM}$ ) y AAPH (19,12 mM) disueltos en tampón fosfato 75 mM pH 7,4, y LF en distintas diluciones ( $1,25 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-3} \mu\text{l}$ ). Se registra la disminución de la intensidad de la fluorescencia durante 25 min, realizándose medidas cada min para una longitud de onda de excitación de 485 nm y una

longitud de onda de emisión de 520 nm. La reacción se desencadena al añadir el AAPH.

El ensayo se realiza por triplicado, utilizándose como blanco H<sub>2</sub>O milliQ. Se representa la fluorescencia frente al tiempo. En cada experimento se construye una recta patrón con concentraciones crecientes de Trolox (1,25 - 30  $\mu$ M) (Fig. 3.2). ORAC se expresa en equivalentes de Trolox (mM).

El coeficiente de variación intra- e interensayo fue 2,6 y 3,2, respectivamente.

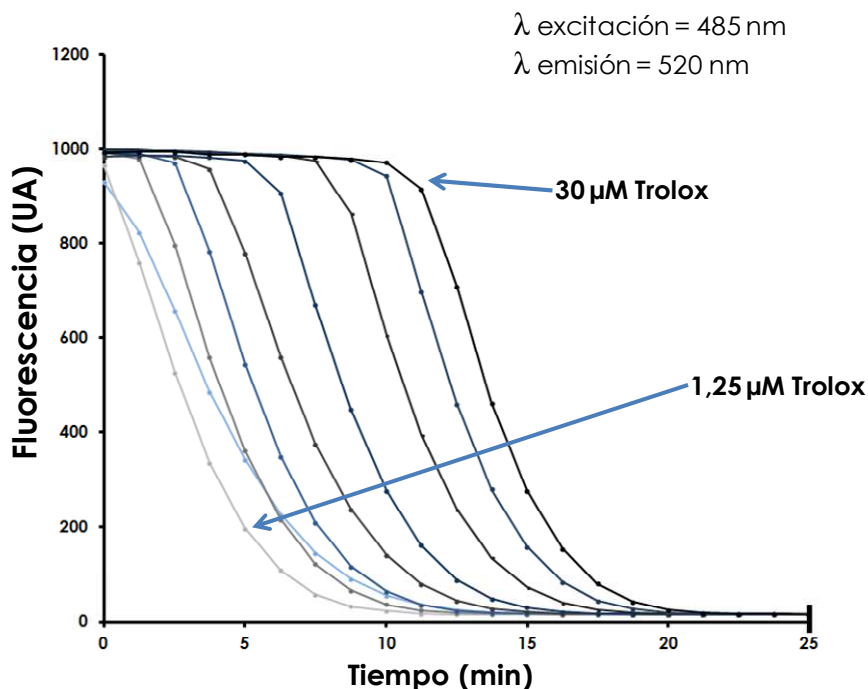


Figura 3.2. Curvas de fluorescencia para Trolox en el método ORAC.

### 3.6 VITAMINA E

La vitamina E presenta diferentes vitámeros entre los que se encuentran el  $\alpha$  y el  $\gamma$ -tocoferol. La cantidad presente en LF de estas dos formas de vitamina E

se determina por HPLC de fase reversa. El método se basa en el descrito por Schüep y cols. (1994).

Previamente al análisis cromatográfico se extraen los lípidos del LF con n-heptano, como se describe a continuación. Se toman 200  $\mu\text{l}$  de LF y se añaden 800  $\mu\text{l}$  de etanol con hidroxitolueno butilado (BHT) al 0,05 % y ácido ascórbico al 0,1 %. Se almacena a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la determinación. El día del ensayo se añaden 2,37 nmol de  $\delta$ -tocoferol (patrón interno en el proceso de extracción e inyección en el HPLC, ya que este isómero no está presente en los fluidos biológicos) a cada muestra, se agita el tubo durante 30 s y seguidamente se extraen los lípidos con 1 ml de n-heptano. Tras agitar vigorosamente las muestras durante 2 min, éstas se centrifugan a  $2000 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min para separar las fases. Se toma la fase orgánica superior y se repite la extracción añadiendo a la fase acuosa el mismo volumen de n-heptano. Se evapora el disolvente en concentrador-evaporador (SpeedVac Concentrator, SAVANT A 290) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El extracto lipídico se resuspende en 20  $\mu\text{l}$  de isopropanol y se añaden 80  $\mu\text{l}$  de fase móvil (metanol:etanol:isopropanol, 65:33,25:1,75), las fases se pasan a través de filtros de nylon de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  y se desgasifican con una bomba de vacío y gaseando con helio). Las muestras se pasan a través de un filtro de nylon de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  y se llevan al vial de inyección.

Se construyen rectas de calibrado a concentraciones crecientes de los patrones  $\alpha$ -tocoferol (0-8 nmol/50  $\mu\text{l}$ ) y  $\gamma$ -tocoferol (0-2 nmol/50  $\mu\text{l}$ ) disueltos en etanol (Sigma, Madrid, España). Las concentraciones reales de cada forma de tocoferol se determinan a partir de la absorbancia correspondiente para cada caso y aplicando su coeficiente de extinción molar.

$$\alpha\text{-tocoferol: } \lambda = 292\text{ nm } \varepsilon = 3,26\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$$

$$\gamma\text{-tocoferol: } \lambda = 298\text{ nm } \varepsilon = 3,81\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$$

$$\delta\text{-tocoferol: } \lambda = 298\text{ nm } \varepsilon = 3,52\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$$

En el HPLC (Kontron) se lleva a cabo la separación isocrática, utilizando una columna Kromaphase C18 (30 cm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) y una precolumna Waters

Spherisorb ODS (1 cm x 4,6 mm ID, 5  $\mu$ m) con el mismo empaquetamiento (flujo de 1 ml/min), a temperatura ambiente y mediante detección a 295 nm.

La columna se regenera tras cada sesión cromatográfica lavándose con una mezcla H<sub>2</sub>O:metanol (7:25). El programa cromatográfico utilizado tiene una duración de 8,5 min para los patrones y 16,5 min para las muestras.

El tiempo de retención de los diferentes tocoferoles es  $4,35 \pm 0,38$  min para  $\delta$ -tocoferol,  $4,80 \pm 0,36$  min para  $\gamma$ -tocoferol y  $5,40 \pm 0,53$  min para  $\alpha$ -tocoferol. Las curvas de calibrado se construyen representando las áreas integradas frente a la concentración de tocoferol.

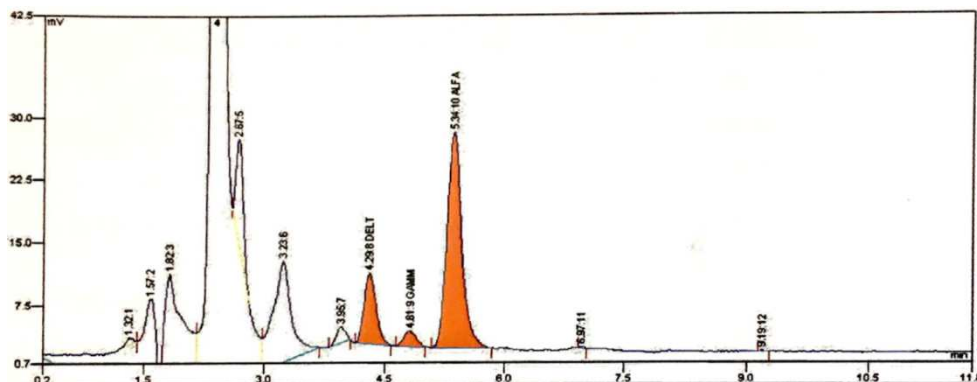


Figura 3.3. Cromatograma representativo de la determinación de los diferentes tocoferoles en el LF.

### 3.7 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

La cuantificación de NO es difícil en medios biológicos, debido a su corta vida media (de 6 a 10 s) y a sus bajas concentraciones y por ello se cuantifican sus metabolitos estables: nitrito y nitrato. El nitrito es el único producto estable de la autooxidación del NO, y el nitrato se forma por la reacción entre el NO y la oxihemoglobina.

La determinación de NO se realiza utilizando el método de *Miranda y cols. (2010)* basado en la reacción de Griess (*Griess, 1879*), adaptado a placas de 96 pocillos como se describe en *Aurrekoetxea y cols. (2010)*.

La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida (SULF) con nitrito en medio ácido, seguido por un acoplamiento con aminas bicyclicas tales como dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina (NEDD). Los nitratos presentes en la muestra se reducen a nitritos por acción del tricloruro de vanadio ( $\text{VCl}_3$ ) (Fig. 3.4). Posteriormente se registra la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

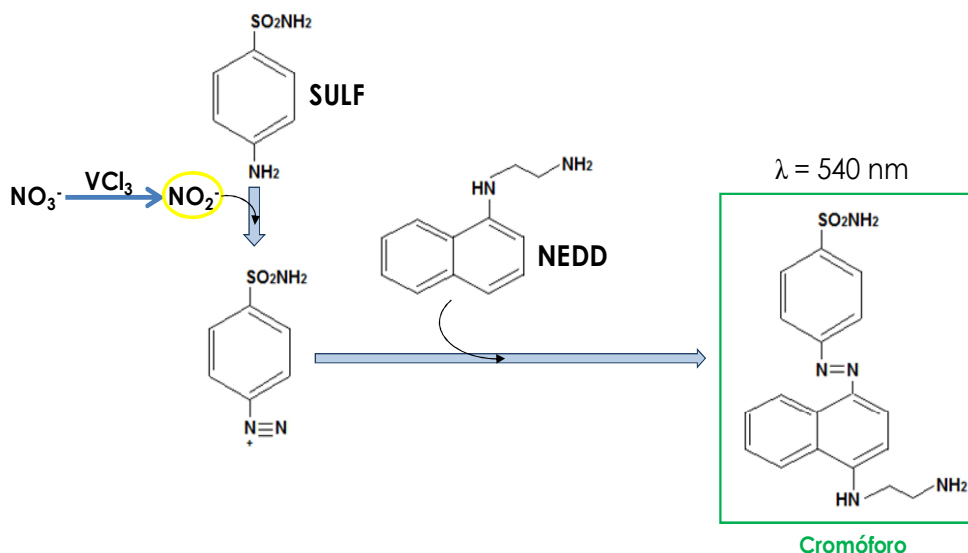


Figura 3.4. Reacción de los reactivos de Griess con nitrito.

En el ensayo se utilizan los siguientes reactivos:

- $\text{VCl}_3$  63 mM en HCl 1,33 M. Se filtra a través de filtros de  $0,22 \mu\text{m}$  y se almacena en oscuridad a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante un tiempo máximo de 15 días,
- NEDD 10,24 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. Se almacena a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- SULF 309,7 mM en HCl al 10 %. Se filtra ( $0,22 \mu\text{m}$ ) y se almacena en oscuridad a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Antes de realizar el ensayo se mezclan los reactivos de Griess (NEDD y SULF) en una proporción 1:1.

La determinación de NO se lleva a cabo por una reacción colorimétrica (lector de placas Bio-tek Synergy™ HT) en un volumen final de  $200 \mu\text{l}$  que

contiene  $\text{VCl}_3$  15,75 mM, NEDD 1,28 mM, SULF 38,71 mM y 100  $\mu\text{l}$  de LF previamente desproteinizado.

La eliminación de las proteínas plasmáticas de la muestras se realiza añadiendo etanol frío en una proporción 1:3. A continuación se agitan los tubos y se dejan reposar 10 min en hielo. Se centrifugan a 14000 x g durante 10 min a 4 °C y se trasvasa inmediatamente el sobrenadante a un tubo eppendorf.

El ensayo se realiza por duplicado, utilizándose como blanco  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. En cada experimento se construye una recta patrón con concentraciones crecientes de  $\text{NaNO}_3$  disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ (0,15-5 nmoles/pocillo). Se registra la absorbancia a 540 nm y se representa frente a la concentración de  $\text{NaNO}_3$ . La absorbancia de las muestras de LF se extrapola en la recta patrón.

La concentración de NO se expresa como  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$ .

El coeficiente de variación intra- e interensayo para la determinación NO fue 3,3 y 6,0, respectivamente.

**Para todas las actividades que se describen a continuación se ha utilizado un lector de placas de 96 pocillos Bio-tek Synergy™ HT Multi-Detector de fluorescencia, absorbancia y luminiscencia.**

### 3.8 ACTIVIDAD CATALASA

La catalasa cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  (Fig. 3.5).

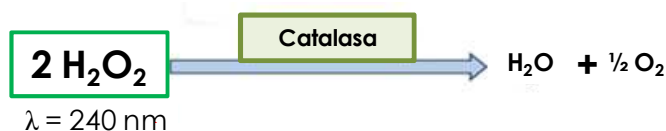


Figura 3.5. Reacción enzimática catalizada por catalasa.

La actividad catalasa se analiza según el método de Cohen y cols. (1996).

Se determina la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espectrofotométrica a una longitud de onda de 240 nm a 30 °C en un volumen final de 250 µl. La absorbancia se registra durante 3 min a intervalos de 7 s.

La reacción se inicia añadiendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37,5 mM en tampón fosfato potásico 100 mM, pH= 6,8 a 1 µl de LF. La medida se realiza por triplicado y se utiliza H<sub>2</sub>O milliQ como blanco.

La actividad se calcula teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar experimental del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\epsilon=0,039 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como µmol/min/ml.

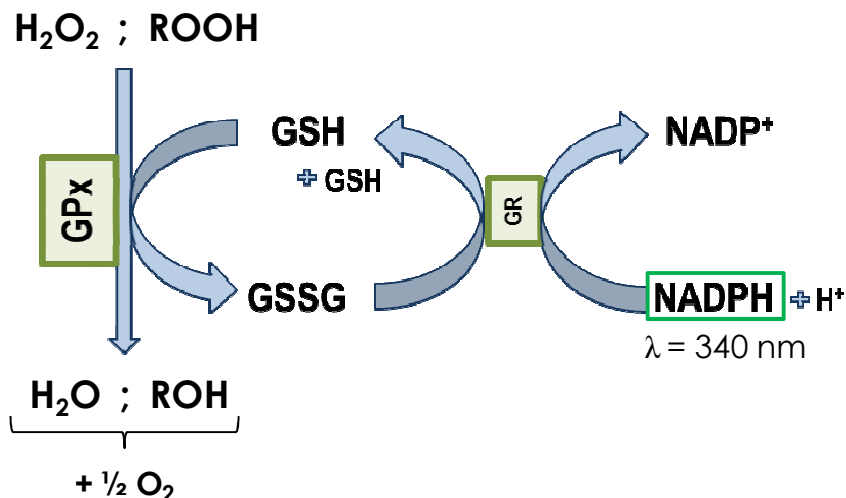
El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método fue 7,1 y 9,1 respectivamente.

### 3.9 ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

La GPx comparte su sustrato con la catalasa, pero puede reaccionar con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos. Es un enzima dependiente de selenio que utiliza glutatión como reductor, formando disulfuro de glutatión. El GSH se regenera mediante la acción de la GSSG reductasa, que utiliza como reductor NADPH proveniente principalmente de la ruta de las pentosas fosfato (Fig. 3.6).

Se determinaron las actividades enzimáticas GPx total y GPx dependiente de selenio (Se-GPx) mediante reacciones acopladas.

La determinación se realiza según el método de *Wilson y cols. (1989)* adaptado a placas de 96 pocillos. El método se basa en la capacidad de GPx de catalizar la reducción del hidroperóxido de cumeno (HPC) (actividad GPx total), y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (actividad Se-GPx). Se determina la desaparición de NADPH espectrofotométricamente.



**Figura 3.6.** Reacción enzimática catalizada por GPx utilizando como sustratos  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxido de cumeno (ROOH).

Cada pocillo contiene en un volumen final de 225  $\mu\text{l}$  tampón fosfato potásico 34,2 mM, pH=7,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,94 mM, azida sódica 1,40 mM, glutatión reductasa 0,45 U, GSH 0,45 mM, NADPH 0,2 mM, y HPC 0,72 mM o  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,78 mM, y LF (4 volúmenes diferentes comprendidos entre 20 y 40  $\mu\text{l}$ ). El blanco lleva  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. La reacción se inicia al añadir el sustrato (HPC o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se registra la absorbancia (Abs) a una longitud de onda de 340 nm cada 60 s durante 15 min a una temperatura de 30  $^\circ\text{C}$ . El ensayo para cada actividad GPx se realiza por duplicado.

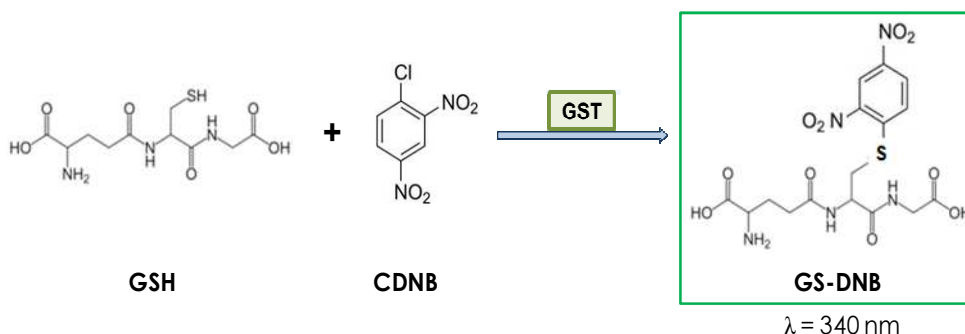
Se representan las pendientes (Abs/tiempo) frente al volumen de LF y se ajusta la curva a un modelo de regresión lineal. Se obtiene la actividad específica GPx, que corresponde a la pendiente de la ecuación de la recta, aplicando el coeficiente de extinción molar experimental  $\epsilon = 3,065 \text{ mM}^{-1}$ .

Los resultados se expresaron como nmol/min/ml de LF.



### 3.10 ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST)

El enzima cataliza la conjugación de GSH con 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB). La reacción se produce por una sustitución nucleófila en la que el GSH (nucleófilo) sustituye al cloro del CDNB (grupo saliente) para dar lugar a un compuesto coloreado (conjugado de glutatión, GS-DNB) (Fig. 3.7).



**Figura 3.7. Reacción catalizada por glutatión S-transferasa a partir de 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB).**

La actividad GST se mide espectrofotométricamente, según una adaptación del método de *Habig y cols. (1974)*.

El ensayo se lleva a cabo a 30 °C en un volumen final de 250  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción contiene tampón fosfato potásico 80 mM, pH=6,5,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM, GSH 2 mM, CDNB 2 mM y 25  $\mu\text{l}$  de LF o  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ en el caso del blanco.

La reacción se desencadena al añadir el sustrato (CDNB). Se registra la absorbancia del GS-DNB a una longitud de onda de 340 nm cada 50 s durante 9 min. El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad GST en la muestra. La actividad se calcula aplicando el coeficiente de extinción molar experimental del GS-DNB  $\epsilon=9,6 \text{ mM}^{-1}$ . El ensayo se realiza por triplicado.

Los resultados se expresan como nmol/min/ml de LF.

El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método fue 1,7 y 2,3 respectivamente.

### 3.11 ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

SOD cataliza la reacción de eliminación del radical anión superóxido ( $O_2^-$ ) mediante su transformación en  $H_2O_2$ , el cual puede ser destruido a su vez por las actividades catalasa o glutatión peroxidasa.

La actividad SOD se determina por colorimetría mediante la utilización de un Kit enzimático (SOD determination Kit, Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza), basado en el método de Zhou y cols. (2006). En este método se genera  $O_2^-$  por el sistema xantina/xantina oxidasa (XOD). El  $O_2^-$  reacciona con el reactivo WST, formando un compuesto formazán (WST-formazán) coloreado, que se detecta a una longitud de onda de 540 nm (Fig. 3.8). SOD compite con el WST por el  $O_2^-$ , de forma que disminuye la formación del producto coloreado formazán. Así, mediante este ensayo de competición se determina indirectamente la actividad SOD.

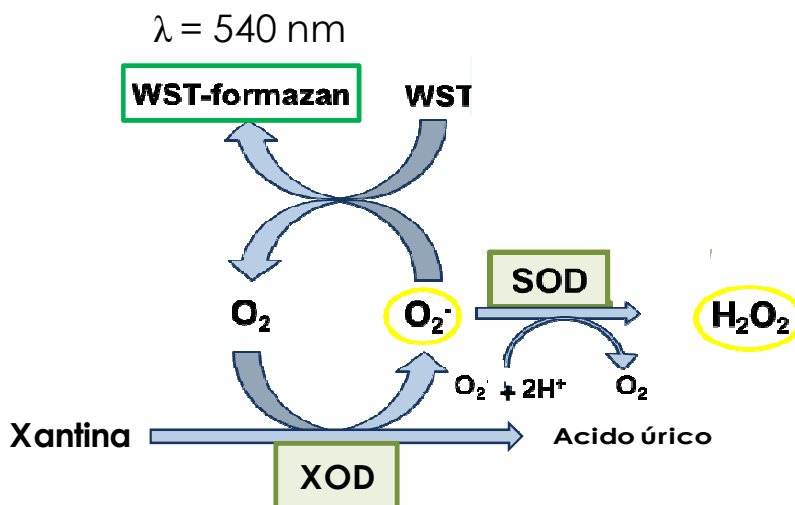
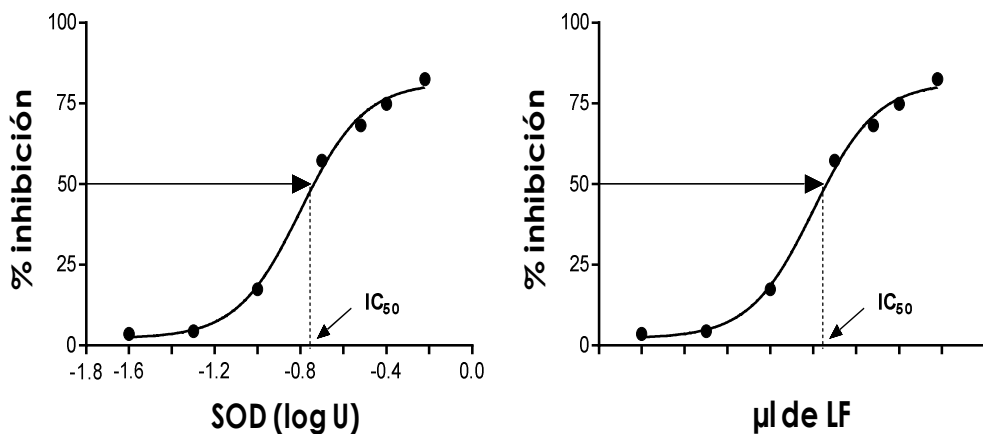


Figura 3.8. Reacciones acopladas para la determinación de la actividad SOD

El ensayo se adaptó a placas de 96 pocillos en un volumen final de 275  $\mu$ l siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada experimento se ensayan diferentes cantidades de LF (5-40  $\mu$ l), por duplicado, utilizándose  $H_2O$  milliQ como blanco. El aumento de la absorbancia se determina cada 60 s durante 12 min a 37 °C. Para cada cantidad de LF se representa la absorbancia frente

al tiempo. De las gráficas se calcula la pendiente de la curva y el porcentaje de inhibición respecto a un control sin LF. Para calcular el IC<sub>50</sub> (cantidad de LF necesaria para inhibir un 50 % la formación de WST-formazán) se representa el % de inhibición frente a la cantidad de LF, ajustándose las gráficas a curvas semilogarítmicas utilizando el programa GraphPad Prism 4 para Windows (San Diego, CA, USA)(Fig. 3.9).

En cada experimento se construye una recta patrón con SOD comercial (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU) de concentraciones crecientes de (0,01-10 U/ml) para transformar el valor IC<sub>50</sub> en unidades de SOD.



**Figura 3.9.** Ejemplo de la curva de inhibición preparada con SOD comercial para expresar los resultados de SOD como unidades/ml de LF.

Los resultados se expresan como U de SOD U/ml de LF. Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima en la muestra que provoca un 50 % de inhibición (IC<sub>50</sub>) de la velocidad de formación del WST-formazán (McCord y Fridovich, 1969).

### 3.12 PON1 ARILESTERASA

La actividad arilesterasa se determina según el método de Brophy y cols. (2001). El método utiliza como sustrato fenilacetato. El enzima cataliza la hidrólisis del éster aromático generando fenol, compuesto que se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 270 nm (Fig. 3.10).

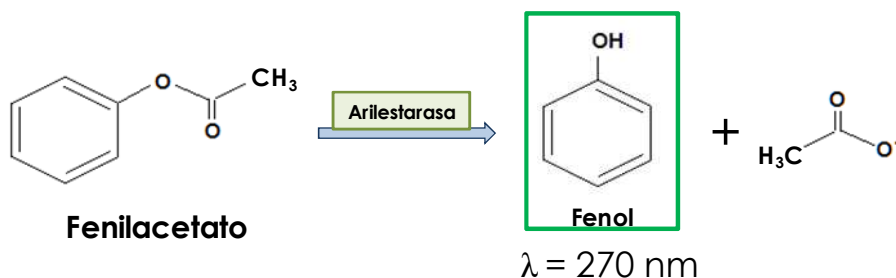


Figura 3.10. Hidrólisis de fenilacetato catalizada por arilesterasa.

Se registra la aparición del producto durante 10 min cada 50 s. El ensayo se realiza a una temperatura de 30 °C en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  conteniendo tampón Tris-HCl 6 mM, pH=8,0, CaCl<sub>2</sub> 0,66 mM, fenilacetato 12 mM y 0,2  $\mu\text{l}$  de LF. Se utiliza H<sub>2</sub>O milliQ como blanco de la reacción. La reacción se desencadena al añadir el sustrato (fenilacetato). El ensayo se realiza por triplicado.

El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad arilesterasa en la muestra. Ésta se calcula aplicando el coeficiente de extinción molar experimental del fenol  $\epsilon=0,8197 \text{ mM}^{-1}$ .

Los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  de LF.

El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método fue 2,3 y 5,1 respectivamente.

### 3.13 PON1 PARAOXONASA

La actividad arilesterasa se determina según el método de Furlong y cols. (1989), utilizando como sustrato el compuesto organofosforado paraoxón. El

enzima hidroliza el paraoxón a *p*-nitrofenol, compuesto que se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm (Fig. 3.11). Se mide la actividad paraoxonasa en dos condiciones: basal (sin NaCl) y estimulada (con NaCl).

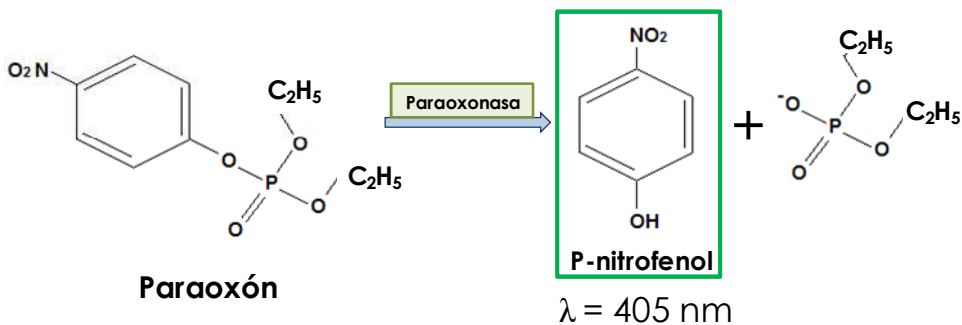


Figura 3.11. Hidrólisis de paraoxón catalizada por paraoxonasa.

La reacción transcurre en tampón Tris-HCl 106,9 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,07 mM, pH 8,5 para la actividad basal y en presencia de NaCl 2,14 mM para la actividad estimulada, ambas en presencia de paraoxón 3 mM. Se realiza en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  de los cuales 5  $\mu\text{l}$  corresponden a LF. El blanco contiene H<sub>2</sub>O milliQ en lugar de LF. La reacción se inicia añadiendo el sustrato (paraoxón) y se monitoriza la aparición del producto cada 52 s durante 12 min, a una temperatura de 30 °C. El ensayo se realiza por triplicado.

El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad paraoxonasa en la muestra. Ésta se calcula aplicando el coeficiente de extinción molar experimental del *p*-nitrofenol  $\epsilon=10,104 \text{ mM}^{-1}$  para la actividad basal y  $9,514 \text{ mM}^{-1}$  para la actividad estimulada.

Los resultados se expresan como nmol/min/ml de LF.

El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método fue 2,9 y 5,4 respectivamente.

### 3.14 PON2 METILPARAOXONASA

La actividad metilparaoxonasa se determina utilizando como sustrato metilparaoxón, que es hidrolizado a *p*-nitrofenol, compuesto que se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm (Fig. 3.12).

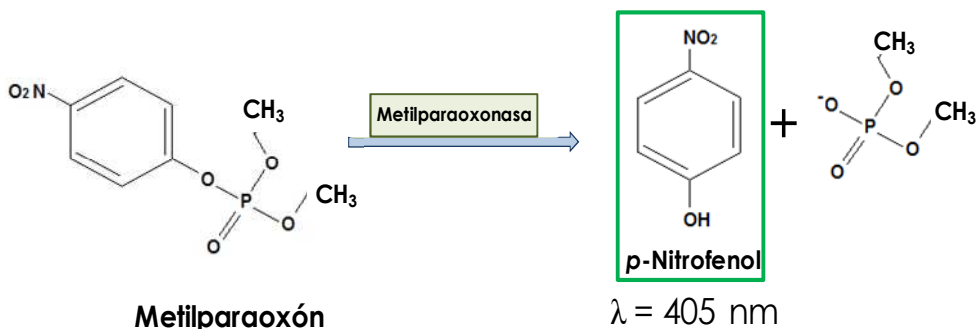


Figura 3.12. Hidrólisis de metilparaoxón catalizada por metilparaoxonasa.

Al igual que para la actividad paraoxonasa, se determina la actividad metilparaoxonasa en dos condiciones: basal (sin NaCl) y estimulada (con NaCl). El procedimiento es el mismo que el descrito para determinar la actividad paraoxonasa.

El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método fue 3,0 y 5,2 respectivamente.

### 3.15 PON3 SIMVASTATINASA

La actividad PON3 simvastatinasa se lleva a cabo de acuerdo con el método descrito por *Suchocka y cols.(2006)* con modificaciones para adaptar el método a muestras de LF. El método mide la actividad lactonasa utilizando como sustrato la lactona de simvastatina (SVL). PON3 convierte la lactona de simvastatina en su forma ácida ( $\beta,\delta$ -dihidroxiácido de simvastatina, SVA) (Fig. 3.13). Tanto el sustrato (SVL) como el producto (SVA) de la reacción se identifican mediante HPLC de fase reversa con detección UV, cuantificándose el producto de la reacción (SVA).

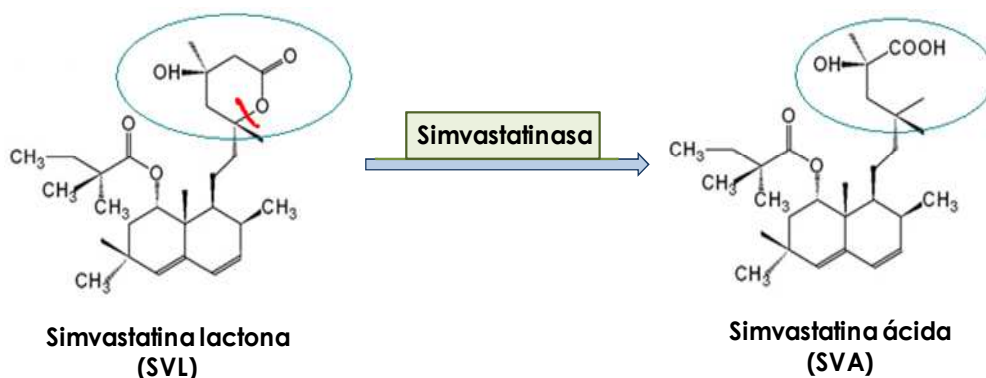


Figura 3.13. Hidrólisis de SVL catalizada por PON3 para dar lugar a SVA.

Primeramente se establecieron las condiciones óptimas para adaptar el método a muestras de LF, como se describe a continuación. La mezcla de reacción contiene tampón Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 7,6. A cada tubo de ensayo se añaden 320 µl del tampón y 30 µl de una disolución de LF diluida 1/10 en agua (400 µl de volumen final). La mezcla se preincuba a 37 °C durante 10 min y la reacción enzimática se inicia al adicionar 50 µl de sustrato (0,2 mg SVL/ml). El sustrato se prepara diariamente a partir de una disolución madre en dimetilsulfóxido (10 mg/ml) que se mantiene congelada hasta el día del ensayo. Después de 30 min, la reacción se detiene mediante la desproteinización por la adición de 400 µl de acetonitrilo acidificado frío. Los tubos se agitan en vórtex durante 5 s y se mantienen en hielo durante 5 min. El líquido se transfiere a un tubo Eppendorf, se centrifuga durante 10 min a 13.000 x g a 4 °C y el sobrenadante se introduce en un vial de HPLC.

El análisis por HPLC de SVL y SVA se lleva a cabo utilizando un cromatógrafo Kontron. La detección de los picos de SVL y SVA se realiza a 239 nm. Se inyectan 30 µl del sobrenadante anterior y la separación se realiza en una columna de fase reversa (Kromasil 100 C18 250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm) por elución isocrática con acetonitrilo/tampón fosfato potásico 30 mM, pH 4,5 (70:30, v/v) como fase móvil, a una velocidad de 1 ml/min y a temperatura ambiente. En estas condiciones el sustrato de la reacción se separa claramente del producto en un único corrido. Los picos están bien resueltos, sin ninguna molécula que pueda interferir (Fig. 3.14). Los picos integrados y sus alturas se

transforman en la cantidad de producto generado por comparación con una curva de calibrado realizada con patrones comerciales de SVL y SVA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). La curva de calibrado se realiza con disoluciones de SVA en metanol (0,25-7  $\mu\text{g/ml}$ ). La curva de calibración se realiza representando el área y la altura de los picos frente a la cantidad de SVA introducida en la columna.

La actividad PON3 se expresa como nmol/min/ml.

El coeficiente de variación intra- e interensayo para este método fue 6,4 y 8,6 respectivamente

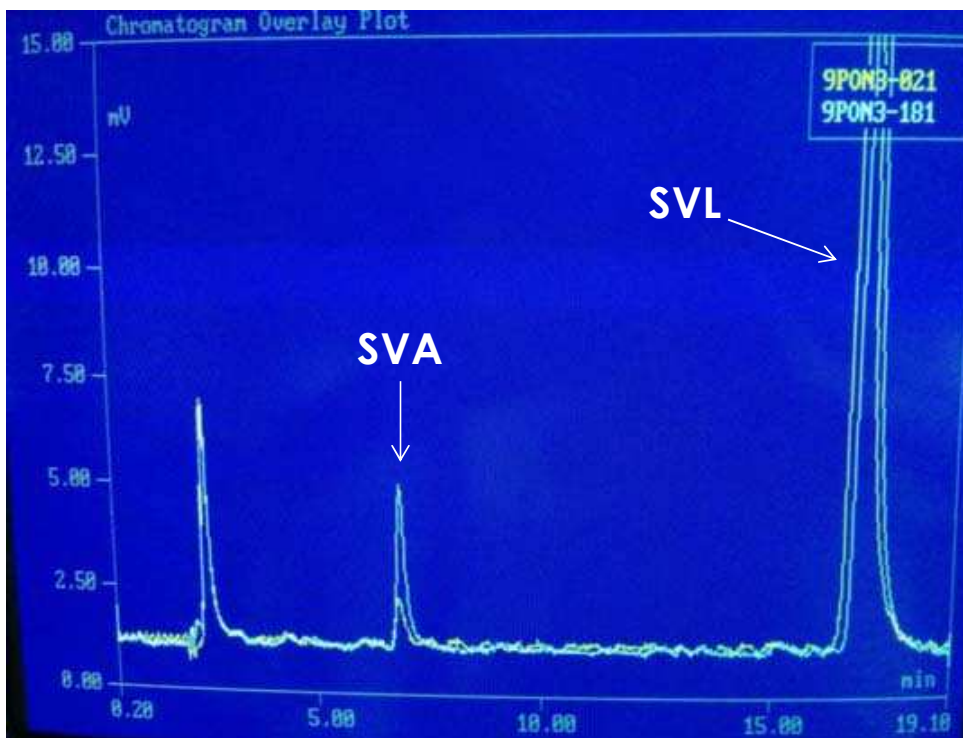


Figura 3.14. Cromatograma representativo de la determinación de SVL.



### 3.16 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PON1, PON2 Y PON3

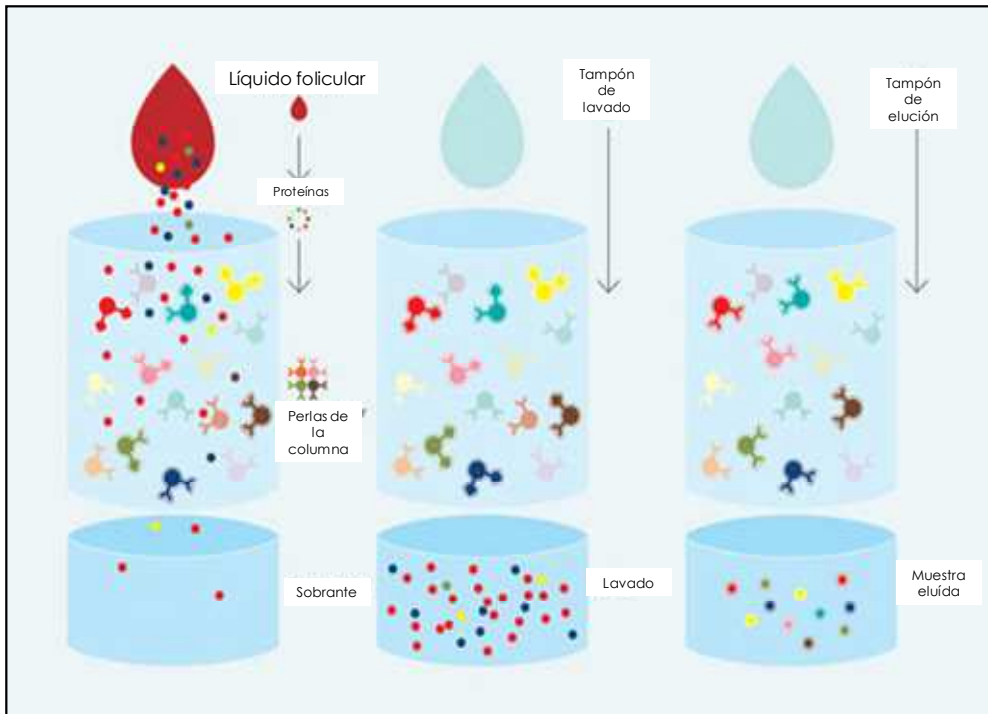
La cuantificación de las proteínas PON1, PON2 y PON3 en el LF se realizó mediante transferencia western. Para ello, en primer lugar se optimizó el procedimiento.

#### **ENRIQUECIMIENTO DE PROTEÍNAS MINORITARIAS DEL LF**

La presencia de proteínas mayoritarias presentes en la muestra de LF (por ejemplo, albúmina) hace que la detección de las proteínas minoritarias sea extremadamente difícil, siendo necesario utilizar una etapa previa para eliminar las primeras. En el caso de las proteínas PON1 y PON3 no fue necesaria esta etapa comprobándose que no había interferencias en su detección. Sin embargo, para identificar PON2 fue necesario este procesamiento previo, como se describe a continuación.

Las muestras de LF se trataron con un kit comercial ProteoMiner Large Capacity (Bio-Rad, Alcobendas, Madrid, España). El proceso se realizó como se indica por el fabricante.

Se elimina la disolución de almacenamiento de la columna y ésta se lava dos veces con tampón fosfato sódico (tampón de lavado: NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,4). Se añade el LF (1,8 ml) a la columna, que se mantiene girando durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lava la columna dos veces con tampón de lavado para eliminar el exceso de proteínas no unidas. Finalmente, las proteínas unidas a los ligandos hexapéptidos se eluyen mediante la adición de 200 µl de urea 4 M, CHAPS al 1 % y ácido acético al 5 %.



**Figura 3.15. Procedimiento para concentrar proteínas mediante el kit ProteoMiner.** La columna elimina una gran parte de las proteínas mayoritarias en una mezcla compleja, lo que facilita la detección de biomarcadores de proteínas menos abundantes. La muestra se mezcla con la disolución de hexapéptidos unidos a perlas cromatográficas que contiene la columna. Las proteínas mayoritarias saturarán rápidamente sus ligandos hexapeptídicos, y el exceso de proteínas pueden ser eliminadas por lavados, mientras que las proteínas minoritarias seguirán vinculadas a sus ligandos concentrándose en el soporte cromatográfico.

• **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR TRANSFERENCIA WESTERN**

Las muestras del LF enriquecidas y no enriquecidas y las proteínas humanas recombinantes PON1, PON2 y PON3 se desnaturalizan en tampón Laemmli (Tris-HCl 300 mM, glicerol al 50 %, SDS al 10 %, DTT 250 mM, y azul de bromofenol al 0,01 %, pH 6,8) por ebullición a 95-100 °C durante 5 min.

Los geles de poliacrilamida (12 %) se preparan utilizando acrilamida/bis-acrilamida (30:0,8) y una disolución de persulfato amónico (PSA) y TEMED como agentes de polimerización. El gel separador se prepara con acrilamida/bis-acrilamida al 40 % en tampón Tris-HCl 2 M, pH 8,8, SDS al 0,1 % (p/v), PSA 1,31 mM y TEMED al 0,1 %. El gel concentrador se prepara con acrilamida/bis-acrilamida al 13,3 % en tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS al 0,1 % (p/v), PSA 1,31 mM y TEMED al 0,2 %.

Las proteínas se separan por electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes, siendo el tampón de electroforesis Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM y SDS al 0,1 %, y se desarrolla durante aproximadamente 90 min a 175 V para PON1 y 240 min a 100 V para PON2 y PON3. Se utilizan 0,6  $\mu$ l para la detección de PON1, 30  $\mu$ l de la muestra procesada con el Kit comercial ProteoMiner para la detección de PON2 y 3,2  $\mu$ l para la detección de PON3.

El proceso de transferencia en el ensayo de PON1 se lleva a cabo en condiciones semisecas en un tampón de transferencia Tris-HCl 12,5 mM, pH 8,3, glicina 96 mM, SDS al 0,05 % y metanol al 10 %. Las proteínas del gel se transfieren a una membrana Immovilon P (PVDF). El tiempo de transferencia es 1 h a 1 mA/cm<sup>2</sup> con una tensión máxima de 24 V.

Por otro lado, para el análisis de PON2 y PON3 las proteínas separadas por electroforesis se transfieren a membranas de PVDF en condiciones húmedas utilizando tampón de transferencia Tris-HCl 12,5 mM, pH 8,3, glicina 96 mM, SDS al 0,05 % y metanol al 20 %. La transferencia transcurre durante 16 horas a 4 °C con un voltaje constante de 26 V.

Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primario y secundario la membrana se bloquea con tampón de bloqueo TTBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05 %) y leche al 5 %, durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. A continuación, la membrana se incuba durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TTBS, como se indica en la Tabla 3.1. Seguidamente, la membrana se lava tres veces en TTBS para eliminar el anticuerpo primario residual. Posteriormente, la membrana se incuba durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en TTBS y BSA al 5 %. Por último, se realizan tres lavados con TTBS.

**Tabla 3.1. Condiciones de incubación de diferentes anticuerpos anti-PON utilizados en la transferencia western.**

<b>Anticuerpo primario (monoclonal)</b>	<b>Dilución del anticuerpo primario</b>	<b>Tampón de dilución</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución del anticuerpo secundario</b>
<b>PON1</b> (Rat IG2A, R&D System, Abingdon, UK)	7:7000	TTBS + 2% leche	Anti-IgG rat, R&D System, Abingdon, UK	3:1000
<b>PON2</b> (Rat IG2A, R&D System, Abingdon, UK)	6:7000	TTBS + 2% leche	Anti-IgG rat, R&D System, Abingdon, UK	3:1000
<b>PON3</b> (Rat IG2A, R&D System, Abingdon, UK)	6:7000	TTBS + 2% leche	Anti-IgG rat, R&D System, Abingdon, UK	3:1000

Para el proceso de revelado se utiliza reactivo de luminol ECL Clarity™ Western Blot (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se sumergen en ECL y se incuban durante 5 min a temperatura ambiente. La membrana se digitaliza por escáner c-Digit Li-Cor blot (Bonsai advanced technologies S.L., Madrid, España).

Se determina la densidad óptica de las bandas obtenidas mediante densitometría empleando el software Image Studio Lite (Bonsai advanced technologies S.L., Madrid, España). Las proteínas se cuantifican utilizando rectas patrones elaboradas con proteínas humanas recombinantes PON1 (5-20 ng/calle), PON2 (0,5-5 ng/calle, ambas proteínas PON1 y PON2 de ProsPec-Tany TechnoGene Ltd., Ness Ziona, Israel) y PON3 (0,75-7,5 ng/calle, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU).

### **3.17 MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE PROTEÍNAS**

Para el estudio de la modificaciones oxidativas de proteínas, se determinaron en las muestras de LF las concentraciones de los siguientes marcadores: semialdehído glutámico (GSA), semialdehído aminoacético

(AASA), carboximetil-lisina (CML) y carboxietil-lisina (CEL) mediante cromatografía de gases acoplada a detección por espectrometría de masas con monitorización selectiva de iones (SIM-GC/MS), según un procedimiento experimental basado en el descrito por Requena y cols. (2001).

Tras la preparación de la muestra, como se describe a continuación, los metabolitos resultantes se analizan mediante SIM-GC/MS en columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) (Fig. 3.16).

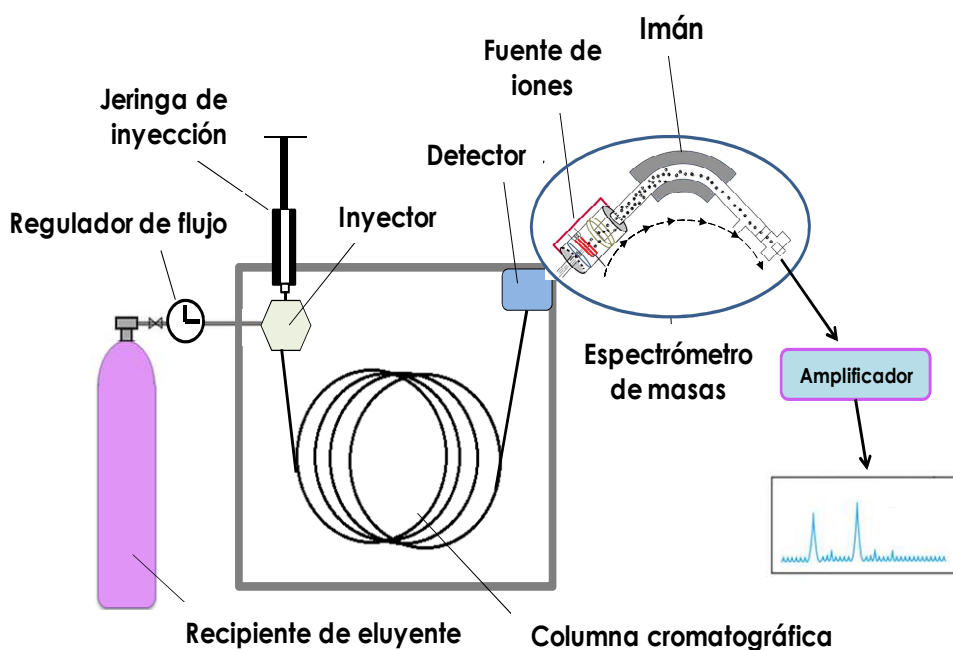


Figura 3.16. Esquema de cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.

Con el fin de evitar la peroxidación lipídica en las muestras a consecuencia de las altas temperaturas que se utilizan en determinados momentos del ensayo, se realiza en primer lugar una deslipidación de la muestra con cloroformo/metanol/H<sub>2</sub>O (2:1:1, v/v/v). A continuación, se precipitan las proteínas presentes con ácido tricloroacético al 10% y se procede durante toda la noche a la reducción de los grupos carbonilo de las proteínas con NaBH<sub>4</sub> 0,5 M, pH=9,2 (el borohidruro sódico no reduce amidas, ésteres, o ácidos carboxílicos) (figura 3.18). Estos grupos carbonilo poseen una gran reactividad en condiciones de estrés y en presencia de radicales libres, por lo que se deben estabilizar para la consecución del ensayo.

A continuación, las proteínas previamente reducidas se someten a hidrólisis ácida con HCl 6 N durante 30 min a 155 °C y en presencia de los patrones internos deuterados.

Como consecuencia de los procesos de reducción e hidrólisis ácida, los aminoácidos modificados oxidativamente *in vivo* se liberan como ácido 6-hidroxi-2-aminovalérico (HAVA) y ácido 5-hidroxi-2-aminocaproico (HACA), que corresponden a los semialdehídos glutámico y aminoadípico, respectivamente (Fig. 3.17).

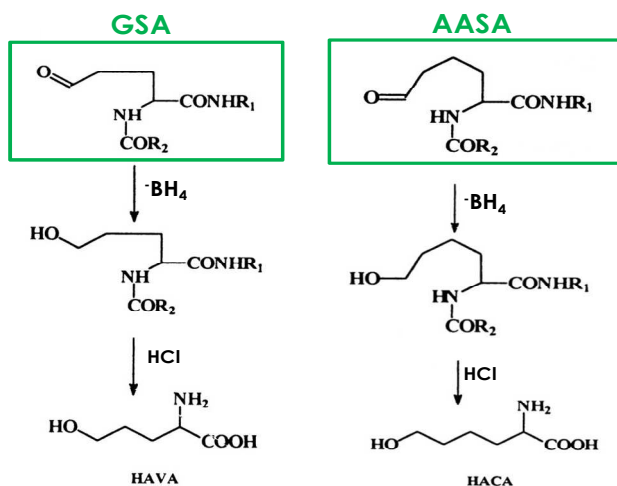


Figura 3.17. Formación de los productos de reducción HAVA y HACA a partir de GSA y AASA.

Los marcadores de glicoxidación y lipoperoxidación, CEL y CML, no sufren reducción alguna y se liberan sin modificación tras la hidrólisis ácida (Fig. 3.18).

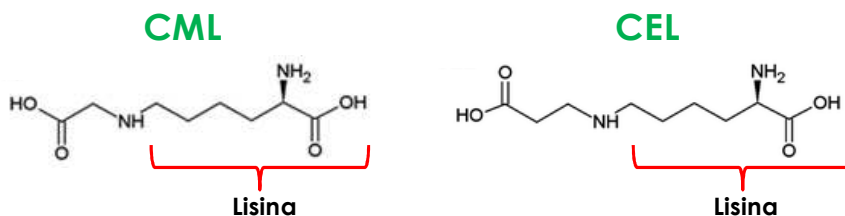


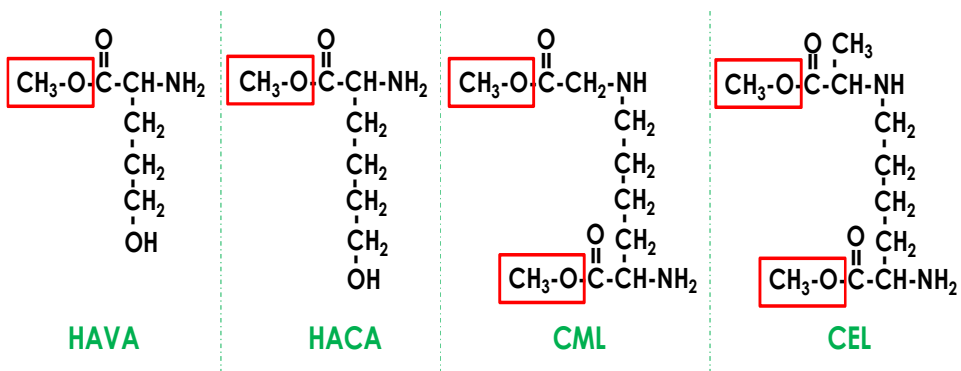
Figura 3.18. Estructura de los marcadores CEL y CML.

Una vez hidrolizada, la muestra se evapora hasta sequedad en concentrador evaporador y se guarda a -80 °C durante toda la noche. Al día siguiente se procede a la derivatización de la muestra, que consiste en

preparar los ésteres metílicos N,O-trifluoroacetilados mediante el método descrito por *Knecht y cols.(1991)*. Para ello, en una primera etapa se lleva a cabo la esterificación de los aminoácidos mediante la adición a la muestra de 1 ml de cloruro de acetilo al 6,5 % en metanol e incubación a 65 °C durante 30 min.

La reacción de esterificación tiene lugar en medio ácido y el mecanismo químico consta de tres pasos: A) protonación del éster, B) adición nucleofílica del agua al carbonilo y C) equilibrio ácido-base, hasta dar lugar al anión metóxido.

El anión metóxido va a incorporarse en los aminoácidos de la muestra, quedando los marcadores de daño oxidativo a determinar en este ensayo en la forma que se muestra en la figura 3.19.



**Figura 3.19. Aminoácidos marcadores de daño oxidativo esterificados.**

Una vez transcurrido el tiempo de la reacción se evaporan las muestras hasta sequedad en el concentrador-evaporador.

La segunda etapa de la derivatización consiste en la fluoración de los aminoácidos previamente metilados. Con este fin se añade 1 ml de anhídrido trifluoroacético a la muestra previamente secada y se deja que transcurra la reacción durante una hora a temperatura ambiente (Fig 3.20). Posteriormente, la muestra vuelve a evaporarse hasta sequedad en concentrador-evaporador.

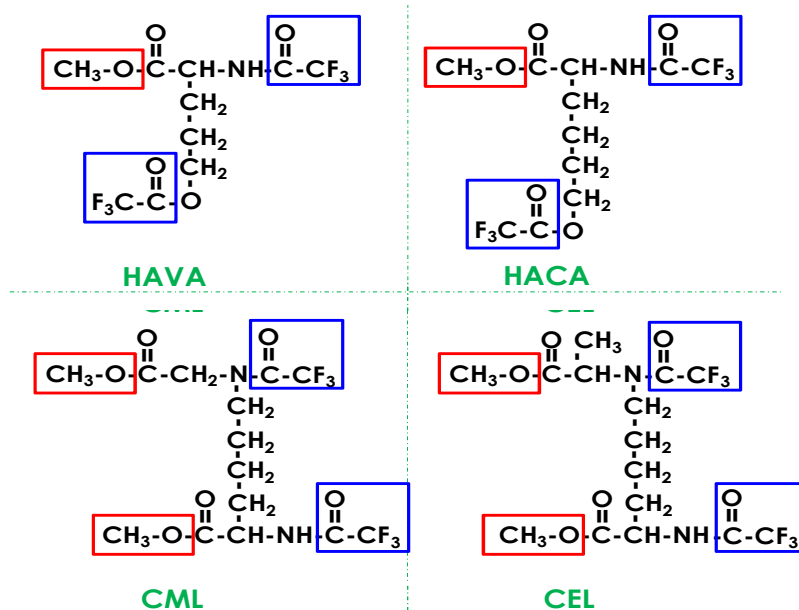


Figura 3.20. Aminoácidos marcadores de daño oxidativo completamente derivatizados.

Las muestras derivatizadas se resuspenden en diclorometano y se trasvasan a los viales de cromatografía de gases para su posterior inyección en el cromatógrafo. Se inyectan 2 µl de muestra, en modo sin división, en la cámara de vaporización que se mantiene a una temperatura de 250 °C. El gas portador (helio) se mantiene durante todo el proceso a un flujo constante de 1 ml/min. Los componentes de la muestra se separan cromatográficamente aplicando el siguiente programa de temperaturas: temperatura de inyección 60 °C, que se mantiene durante 5 min; se aplica una rampa de temperatura de 2 °C/min hasta alcanzar los 150 °C, tras lo cual se incrementa esta rampa a 5 °C/min hasta alcanzar los 240 °C; finalmente se aplica una tercera rampa de 15 °C/min hasta alcanzar los 300 °C, manteniéndose en este estado durante 5 min. La duración total del cromatograma es de 77 min.

Finalmente, la cuantificación se realiza mediante estandarización externa, utilizando curvas patrones construidas a partir de la mezcla de patrones deuterados y no deuterados. La detección y cuantificación de los distintos analitos se lleva a cabo mediante la monitorización selectiva de iones específicos utilizándose los iones característicos de la fragmentación de cada



uno de los compuestos y de sus homólogos deuterados que se muestran en la Fig. 3.21.

Las cantidades de los productos detectados se expresan como micromoles por mol de lisina.

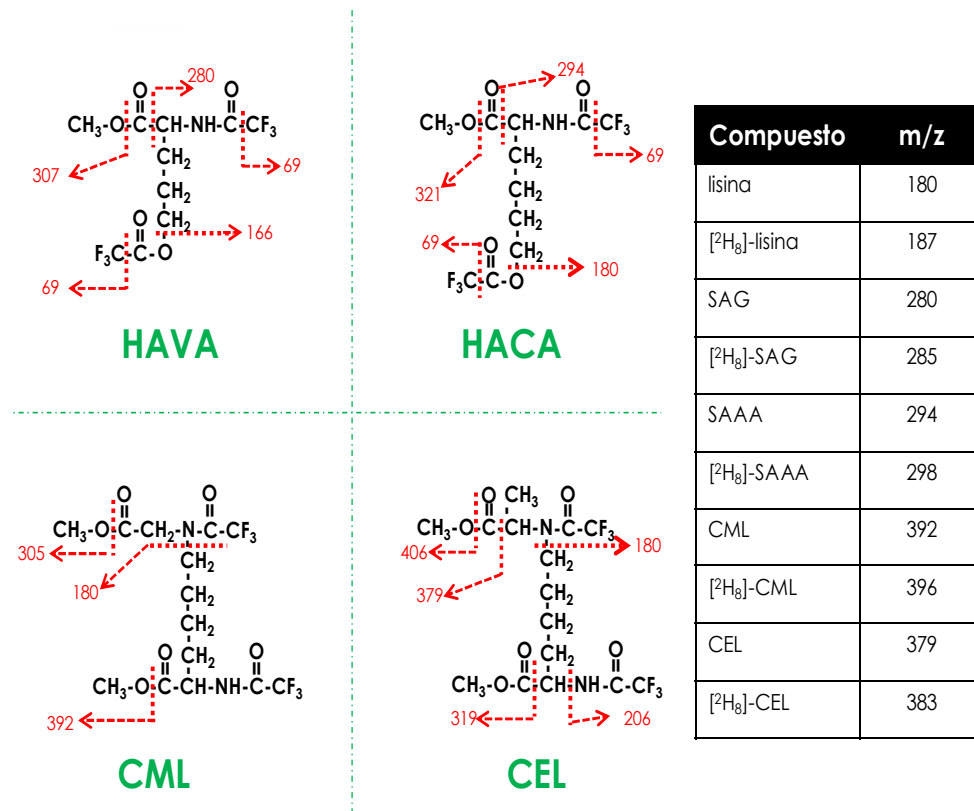


Figura 3.21. Fragmentación de los biomarcadores derivatizados analizados.

### 3.18 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se empleó el paquete estadístico IBM-SPSS Statistics 20.0, ordenando previamente los resultados en tablas confeccionadas con el programa Excel. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar (EE) de la media.

Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si las variables numéricas seguían una distribución normal. Para las variables numéricas cuya distribución no fue normal se compararon las medias utilizando la U de Mann-Whitney para datos independientes (Donantes vs Pacientes) y el test de Wilcoxon para datos pareados (folículos grandes vs folículos pequeños). Por el contrario, cuando los datos se ajustaron a una distribución normal se realizaron las comparaciones entre las medias utilizando la prueba t de Student de dos colas para muestras independientes y muestras pareadas. Se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrado para la asociación entre dos variables categóricas.

Las correlaciones lineales se analizaron mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson o Spearman dependiendo de si la distribución era normal o no. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor de  $p$  fue menor a 0,05 ( $p < 0,05$ , significación bilateral).







## *RESULTADOS*











## 4. RESULTADOS

### 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio está compuesta por 193 mujeres distribuidas en dos grupos: mujeres donantes de óvulos con al menos un recién nacido vivo (Donantes) (N=86); y mujeres con problemas de fertilidad (Pacientes) (N=107). Todas las mujeres se sometieron a un ciclo de estimulación ovárica controlada.

En la Tabla 4.1 se muestran las principales características de las mujeres participantes en el estudio, así como las principales causas de infertilidad.

**Tabla 4.1. Descripción de la población de estudio.**

	<b>Media ± DE (rango)</b>	
	<b>DONANTES</b>	<b>PACIENTES</b>
<b>Edad mujer (años)</b>	27,6 ± 4,0 (19,0 – 35,0)	37,7 ± 3,9 (28,0 – 46,0)***
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,2 ± 2,6 (18,8 – 29,4)	22,8 ± 1,9 (19,2 – 27,7)
<b>Fumadora</b>	34,1%	24,3%
<b>Causa de infertilidad</b>		
- <b>Factor genético</b>		6,9%
- <b>Factor tubárico</b>		4,9%
- <b>Aborto de repetición</b>		9,8%
- <b>Desconocido, baja respuesta, edad, daño iatrogénico</b>		78,4%

\*\*\*p<0,001, significativamente diferente entre Donantes y Pacientes.

Se pueden apreciar diferencias significativas en cuanto a la edad media entre ambas poblaciones, siendo la edad de las mujeres con problemas de fertilidad mayor que en el grupo de Donantes. Respecto al IMC y al hábito tabáquico, no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

Entre las pacientes la etiología de la infertilidad incluye abortos de repetición (9.8%), factor tubárico (4.9%) y factor genético (6.9%). La infertilidad de causa

desconocida, por baja respuesta, edad avanzada o por daño iatrogénico es del 78.4%. Un 58% de los casos mostraron algún tipo de infertilidad masculina en combinación con otras causas.

## 4.2 PARÁMETROS DE FERTILIDAD

Tras un ciclo de estimulación ovárica se recogieron ovocitos, que fueron fertilizados *in vitro* mediante inyección intracitoplasmática (ICSI) o mixta (FIVTE/ICSI). A continuación se describen los siguientes parámetros de fertilidad a) para ambos grupos, Donantes y Pacientes: número de ovocitos totales y maduros, número de folículos antrales y tasa de fertilización, y b) para las Pacientes: tasa de implantación y % de ciclos productivos.

**Tabla 4.2. Parámetros de fertilidad tras un ciclo de estimulación ovárica.**

	<b>Media ± DE</b>	
	<b>DONANTES</b>	<b>PACIENTES</b>
<b>Nº Folículos antrales</b>	19,4 ± 7,0	14,5 ± 8,4***
<b>Nº Ovocitos totales</b>	18,0 ± 0,7	11,9 ± 0,6***
<b>Nº Ovocitos maduros</b>	15,1 ± 0,6	9,5 ± 0,5***
<b>% Ovocitos maduros</b>	84,6 ± 1,6	82,1 ± 1,5
<b>Tasa de fertilización</b>	77,0 ± 1,0	71,7 ± 2,4
<b>Tasa de implantación</b>		
<b>1 embrión</b>		21,1%
<b>2 embriones</b>		19,7%
<b>Obtención de embarazo</b>		
<b>NO</b>		52,9%
<b>SÍ</b>		47,1%

\*\*\*p<0,001, significativamente diferente entre Donantes y Pacientes.

El número de folículos antrales, de ovocitos totales y de ovocitos que se encuentran en metafase II es significativamente mayor en el grupo de Donantes que en el de Pacientes. Sin embargo, el porcentaje de ovocitos maduros no varió. En cuanto a la tasa de fertilización, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones. La obtención de

embarazo tras un ciclo FIV/ICSI con transferencia embrionaria fue próxima al 50%.

## 4.3 COMPOSICIÓN DEL LÍQUIDO FOLICULAR

A continuación se describen los parámetros bioquímicos y el estado antioxidante general del líquido folicular (LF) obtenido tras la punción folicular. Se ha utilizado el LF de folículos grandes procedentes tanto de mujeres Donantes como de Pacientes (población total).

### 4.3.1 Parámetros bioquímicos del líquido folicular

En la Tabla 4.3 se muestran los valores de los parámetros bioquímicos: albúmina, ácido úrico, apo-AI, colesterol total, glucosa, HDLc, proteínas totales y triglicéridos.

Tabla 4.3. Parámetros bioquímicas del LF

	<b>Media ± EE</b>
<b>Albúmina (g/l)</b>	36,4 ± 0,5
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	3,8 ± 0,1
<b>Apo-AI (mg/dl)</b>	120,9 ± 4,2
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	31,7 ± 1,3
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	50,1 ± 1,4
<b>HDLc (mg/dl)</b>	28,6 ± 1,2
<b>Proteínas totales (g/l)</b>	54,8 ± 1,0
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	11,0 ± 0,6

El análisis bioquímico muestra valores similares a los descritos en bibliografía para el líquido folicular (Valckx y cols., 2012).

### 4.3.2 Estado antioxidante del líquido folicular

En la Tabla 4.4 se muestra la actividad antioxidante total determinada por dos métodos diferentes (TAC y ORAC), las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol, y NO, así como las siguientes actividades enzimáticas: catalasa, GPx total y dependiente de Se, GST, SOD y de las proteínas de la familia de las paraoxonasas: arilesterasa, paraoxonasa basal (-) y estimulada (+), metilparaoxonasa basal (-) y estimulada (+) y simvastatinasa.

Tabla 4.4. Estado antioxidante del LF.

	<b>Media <math>\pm</math> EE</b>
<b>TAC (mM Trolox)</b>	2,2 $\pm$ 0,0
<b>ORAC (mM Trolox)</b>	11,8 $\pm$ 0,2
<b><math>\alpha</math>-Tocoferol (<math>\mu</math>M)</b>	4,5 $\pm$ 0,1
<b><math>\gamma</math>-Tocoferol (<math>\mu</math>M)</b>	0,28 $\pm$ 0,02
<b>NO (<math>\mu</math>M)</b>	63,7 $\pm$ 2,0
<b>Catalasa (<math>\mu</math>mol/min/ml)</b>	36,9 $\pm$ 1,4
<b>GPx total (nmol/min/ml)</b>	53,0 $\pm$ 1,7
<b>GPx-Se (nmol/min/ml)</b>	44,7 $\pm$ 1,4
<b>GST (nmol/min/ml)</b>	40,3 $\pm$ 1,6
<b>SOD (U/ml)</b>	12,8 $\pm$ 0,5
<b>Arilesterasa (<math>\mu</math>mol/min/ml)</b>	116,7 $\pm$ 2,6
<b>Paraoxonasa (-) (nmol/min/ml)</b>	120,3 $\pm$ 5,3
<b>Paraoxonasa (+) (nmol/min/ml)</b>	346,3 $\pm$ 17,5
<b>Metilparaoxonasa (-) (nmol/min/ml)</b>	70,2 $\pm$ 2,8
<b>Metilparaoxonasa (+) (nmol/min/ml)</b>	130,9 $\pm$ 5,5
<b>Simvastatinasa (nmol/min/ml)</b>	14,3 $\pm$ 0,4

Se observa que el LF muestra una capacidad antioxidante que es 5 veces superior cuando se determina por el método ORAC frente a la capacidad de decoloración del radical ABTS<sup>+</sup>. Respecto a la concentración de vitamina E, los

niveles de  $\alpha$ -tocoferol son mayores (15 veces) a los de  $\gamma$ -tocoferol, y representan el 94% de la concentración de la vitamina E en el LF.

De todas las actividades enzimáticas analizadas la más eficaz es la actividad arilesterasa, seguida de la actividad catalasa. Estas actividades se expresan en micromoles por minuto y ml, mientras que el resto de actividades enzimáticas se expresan en nanomoles por minuto y ml. En el caso de las actividades paraoxonasas, la presencia de sales de NaCl aumenta 2 veces las actividades basales paraoxonasa y metilparaoxonasa.

## 4.4 ANÁLISIS DEL LÍQUIDO FOLICULAR EN FUNCIÓN DEL TAMAÑO FOLICULAR Y DE LA POBLACIÓN

Tras la estimulación ovárica se obtuvo por punción folicular LF procedente de 2 folículos contralaterales de cada tamaño (2 pequeños y 2 grandes) para una misma mujer. Se analizó la composición bioquímica y el estado antioxidante del LF de ambos folículos para los dos grupos objeto de estudio (Donantes y Pacientes).

### 4.4.1 Parámetros bioquímicos

En la Tabla 4.5 se describen los parámetros bioquímicos del LF en función del tamaño del folículo y del grupo de procedencia.

En ambas poblaciones se observa que la concentración de ácido úrico es mayor en el LF de folículos grandes. Además, en el grupo de Pacientes se observan mayores concentraciones de albúmina, apo-AI, HDLc y proteínas totales en el LF procedente de folículos grandes. Estas diferencias no se observan en Donantes.

Para un mismo tamaño folicular la concentración de apo-AI y de glucosa es mayor en la población de Donantes que en la de Pacientes.

Tabla 4.5. Parámetros bioquímicos del LF de folículos pequeños y grandes en Donantes y Pacientes.

	<b>DONANTES</b>		<b>PACIENTES</b>	
	<b>Media ± EE</b>		<b>Media ± EE</b>	
	Folículos Pequeños	Folículos Grandes	Folículos Pequeños	Folículos Grandes
<b>Albúmina (g/l)</b>	31,9 ± 2,2	36,6 ± 0,6	28,4 ± 2,2	36,6 ± 1,1*
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	3,4 ± 0,2	3,8 ± 0,1*	3,0 ± 0,3	3,8 ± 0,2*
<b>Apo-AI (mg/dl)</b>	115,0 ± 11,2#	129,8 ± 6,1#	84,8 ± 6,5	112,2 ± 5,3*
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	33,2 ± 4,0	32,4 ± 1,8	26,0 ± 2,4	31,1 ± 2,0
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	61,0 ± 3,7##	60,4 ± 2,5###	49,7 ± 3,8	52,4 ± 4,7
<b>HDLc (mg/dl)</b>	29,3 ± 3,4	29,1 ± 1,7	21,8 ± 2,1	28,1 ± 1,8*
<b>Proteínas (g/l)</b>	49,2 ± 3,5	55,6 ± 0,9	43,8 ± 2,9	55,1 ± 1,8*
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	14,4 ± 2,0	10,9 ± 0,7	12,0 ± 1,2	11,0 ± 0,9

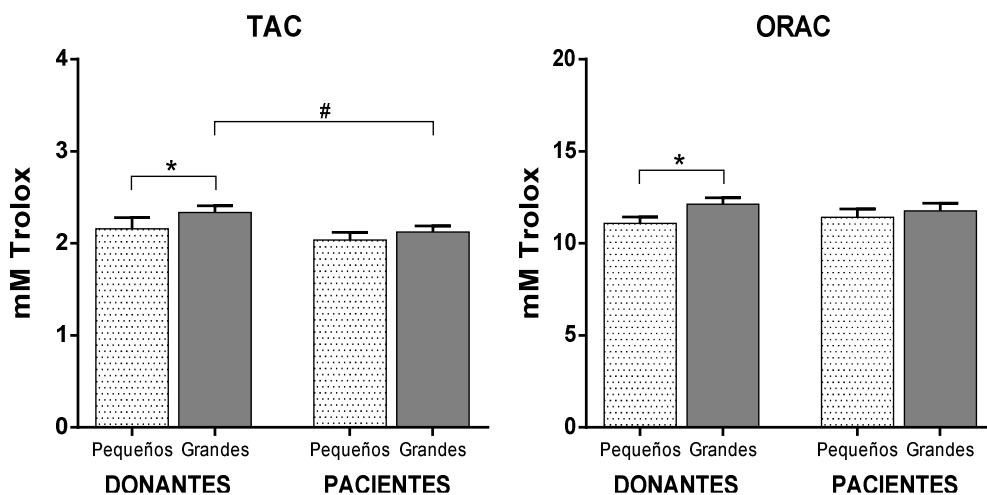
Dentro de una misma fila: \*p<0,05, para distinto tamaño folicular dentro de una misma población; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001, para el mismo tamaño folicular entre poblaciones diferentes.

#### 4.4.2 Actividad antioxidante total (TAC y ORAC)

Como se ha comentado anteriormente, la actividad antioxidante total se determinó mediante el método TAC (ensayo de decoloración del radical ABTS<sup>+</sup>) y el método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno).

Respecto al tamaño folicular, en la población de Donantes se observa que la actividad antioxidante total (TAC y ORAC) es mayor en el LF de folículos grandes que en el de los pequeños. Sin embargo, no se observan diferencias en el grupo de pacientes (Fig. 4.1).

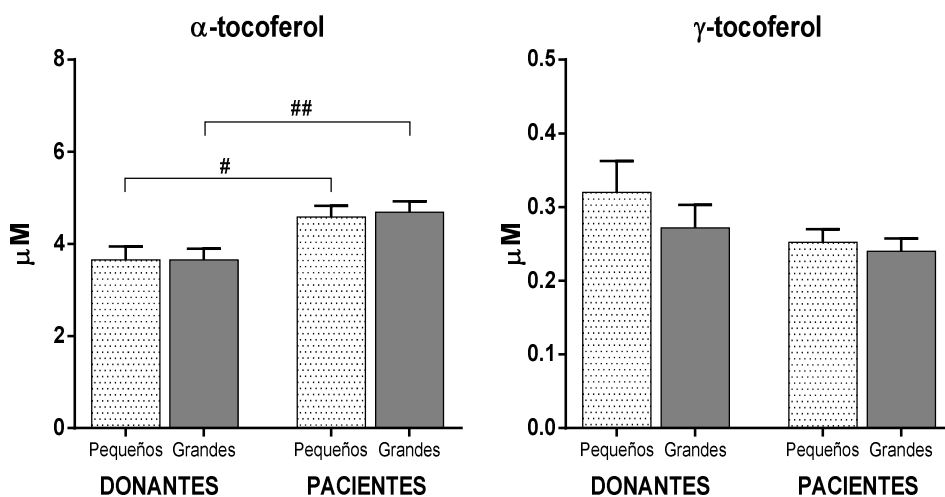
Con respecto al grupo, TAC es significativamente mayor en mujeres Donantes que en Pacientes en el caso de los folículos grandes, no encontrándose diferencias significativas para ORAC (Fig. 4.1)..



**Figura 4.1. TAC y ORAC.** Los valores se expresan como la media + EE. \* $p < 0,05$ , significativamente diferente entre folículos pequeños y grandes para un mismo grupo poblacional; # $p < 0,05$ , significativamente diferente entre Donantes y Pacientes.

### 4.4.3 Vitamina E

Se determinó la concentración de  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol en el LF mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa.



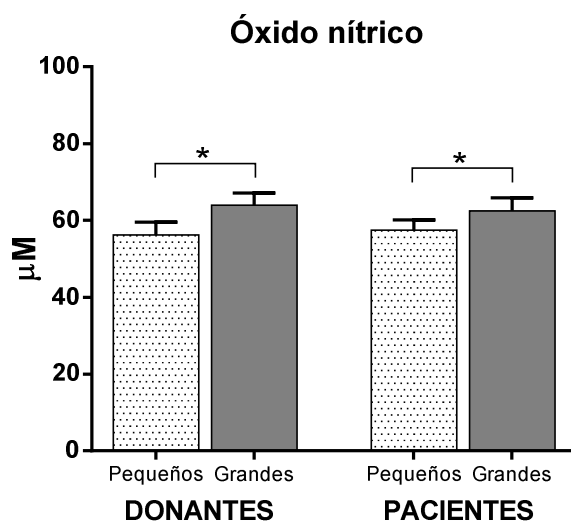
**Figura 4.2. Concentración de  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol.** Los valores se expresan como la media + EE. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ , significativamente diferente entre Donantes y Pacientes para folículos de igual tamaño.



Las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol no varían en función del tamaño folicular para ninguno de los dos grupos poblacionales (figuras 4.2). Por otra parte, cabe destacar que la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en Pacientes es mayor que en Donantes, independientemente del tamaño del folículo. Esta diferencia no se observa para el  $\gamma$ -tocoferol.

#### 4.4.4 Óxido nítrico

Se determinó la concentración de NO en el LF mediante el método de Griess.

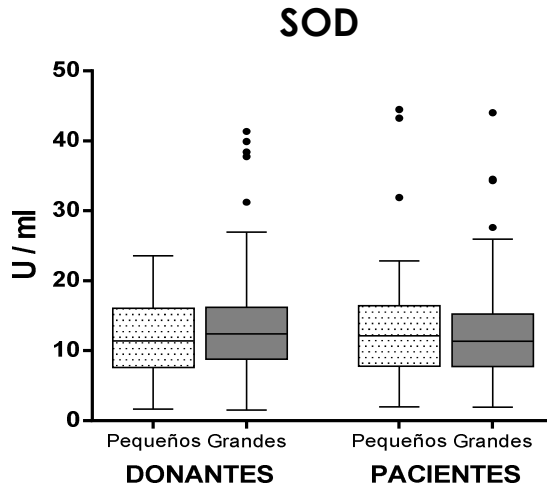


**Figura 4.3. Concentración de NO.** Los valores se expresan como la media + EE. \* $p < 0,05$ , significativamente diferente entre folículos pequeños y grandes para un mismo grupo poblacional (Donantes o Pacientes).

Se observa un incremento de la concentración de NO en el LF al aumentar el tamaño del folículo en ambos grupos. Para un mismo tamaño folicular no se observan diferencias de la concentración de NO en función del grupo poblacional.

### 4.4.5 Superóxido dismutasa

Los resultados obtenidos del análisis de la actividad SOD muestran que no existen diferencias en función del tamaño del folículo ni del grupo poblacional (figura 4.4).

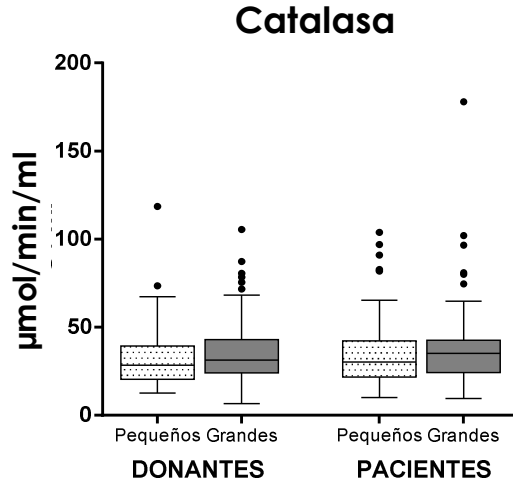


**Figura 4.4. Actividad SOD.** Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos.

### 4.4.6 Catalasa

La actividad catalasa mostró valores claramente superiores a los de otras actividades enzimáticas determinadas (GPx, Se-GPx, y PONs).

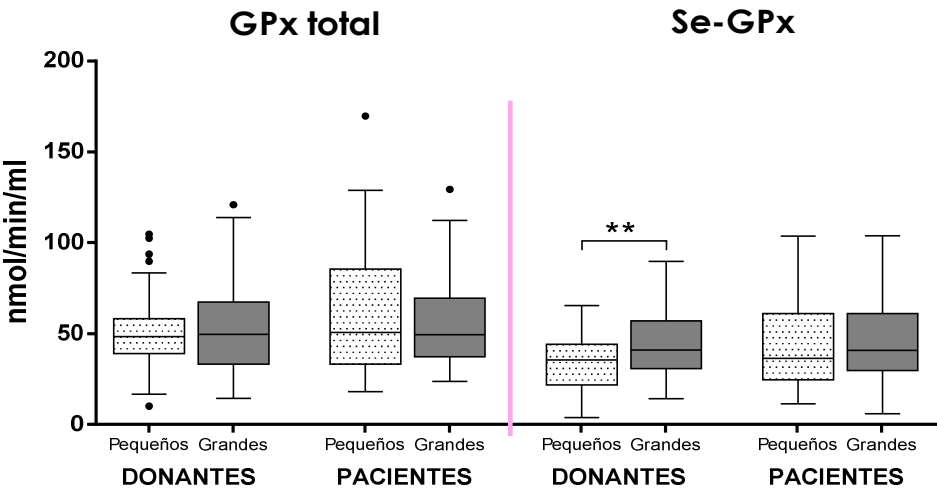
Como se observa en la figura 4.5, la actividad catalasa no varía dependiendo del tamaño del folículo ni del grupo del que procede la muestra.



**Figura 4.5. Actividad catalasa.** Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos.

#### 4.4.7 Glutati6n peroxidasa

Se analiz6 la actividad GPx, tanto total como dependiente de selenio (Se-GPx). Para determinar estas dos actividades se utilizaron los sustratos: hidroper6xido de cumeno (HPC) y per6xido de hidrogeno, respectivamente.



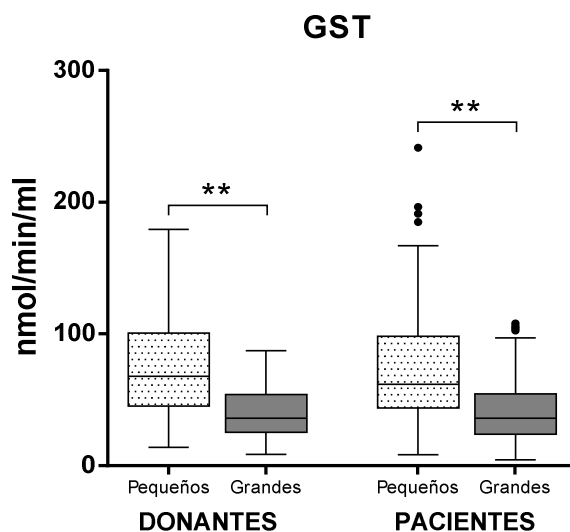
**Figura 4.6. Actividades GPx.** Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos. \*\* $p < 0,01$ , significativamente diferente entre f6liculos peque1os y grandes dentro de un mismo grupo poblacional (Donantes o Pacientes).

Únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas en la actividad GPx dependiente de selenio en el grupo de Donantes, siendo la actividad mayor en folículos grandes que en pequeños.

#### 4.4.8 Glutación S-transferasa

La figura 4.7 muestra los resultados obtenidos para la actividad GST. Cabe destacar que, de forma opuesta a lo que hemos encontrado para otras actividades enzimáticas, la actividad GST disminuye significativamente ( $p < 0,01$ ) al aumentar el tamaño folicular. Estas diferencias tienen lugar tanto en Donantes como en Pacientes.

Para un mismo tamaño folicular la actividad GST no presenta diferencias entre las mujeres fértiles y subfértiles.



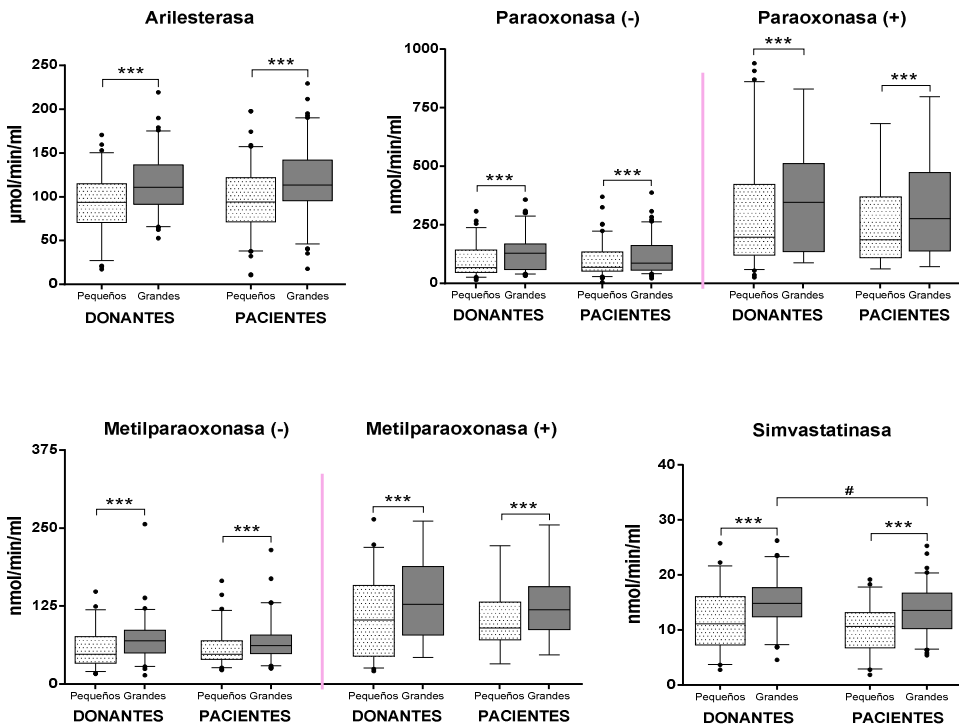
**Figura 4.7. Actividad GST.** Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos. \*\* $p < 0,01$ , significativamente diferente entre folículos pequeños y grandes dentro de un mismo grupo poblacional (Donantes o Pacientes).

### 4.4.9 Sistema paraoxonasa

• **ACTIVIDADES PON1, PON2 Y PON3**

Se han detectado en el LF las actividades enzimáticas de las proteínas de la familia de las paraoxonasas: PON1, PON2 y PON3. Las paraoxonasas presentan diferentes actividades *in vitro* dependiendo del sustrato. En este estudio se han determinado las actividades: arilesterasa (utilizando fenilacetato como sustrato), paraoxonasa (utilizando paraoxón), metilparaoxonasa (utilizando metilparaoxón) y lactonasa (utilizando simvastatina).

Las actividades paraoxonasa y metilparaoxonasa se detectaron en dos condiciones, basal (-) y estimulada (+), dependiendo de si el ensayo contenía o no NaCl.



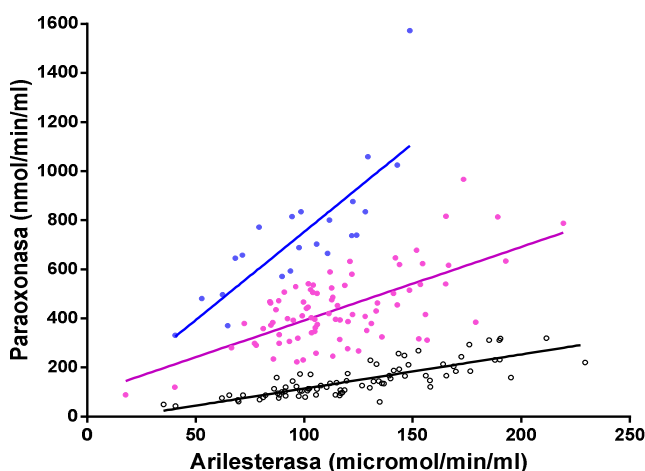
**Figura 4.8. Actividades enzimáticas de la familia de PON.** Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos. \*\*\* $p < 0,001$ , significativamente diferente entre folículos pequeños y grandes dentro de un mismo grupo poblacional (Donantes o Pacientes); # $p < 0,05$ , significativamente diferente entre Donantes y Pacientes para folículos grandes.

Es de destacar que todas las actividades enzimáticas analizadas fueron significativamente mayores ( $p < 0.001$ ) en el LF de folículos grandes que de pequeños, tanto en Donantes como en Pacientes (figura 4.9). En el caso de PON3, se observa, además, que la actividad simvastatinasa del LF de folículos grandes es mayor en Donantes (12,3%) que en Pacientes.

### **DISTRIBUCIÓN DE LOS FENOTIPOS Q192R DE PON1**

Diversos estudios han demostrado que el polimorfismo *PON1* Q192R afecta a la actividad catalítica de PON1 dependiendo del sustrato. Las isoenzimas Q y R de PON1 hidrolizan fenilacetato con similar eficiencia, mientras que la isoforma R de alta actividad hidroliza el paraoxón con mayor eficacia que la isoforma Q de baja actividad. Los genotipos se pueden determinar con los resultados de las dos actividades de PON1: arilesterasa (sustrato fenilacetato) y paraoxonasa (sustrato paraoxón) (Adkins y cols., 1993; Mackness y cols., 1997).

Se analizó la correlación de las actividades paraoxonasa y arilesterasa para la población total. Como se muestra en la figura 4.10 se pueden distinguir tres grupos bien definidos, que se corresponden con los tres genotipos: QQ (pendiente mínima), QR (pendiente intermedia) y RR (línea de máxima pendiente).



**Figura 4.9. Correlaciones entre las actividades paraoxonasa y arilesterasa.**  
Se determinaron en folículos grandes en la población total.

Se representó la distribución acumulativa de las mujeres frente al cociente de las actividades paraoxonasa/arilesterasa. Las gráficas revelan la distribución

trimodal del fenotipo, asignándose los genotipos QQ (cociente  $< 2,0$ ), QR (cociente  $\geq 2,0$  y  $< 6,0$ ) y RR (cociente  $\geq 6,0$ ) (figura 4.11). Las frecuencias de los genotipos no fueron significativamente diferentes entre Donantes (40,7% QQ, 43,0% QR y 16,3% RR) y Pacientes (44,8% QQ, 43,9% QR y 11,2% RR).

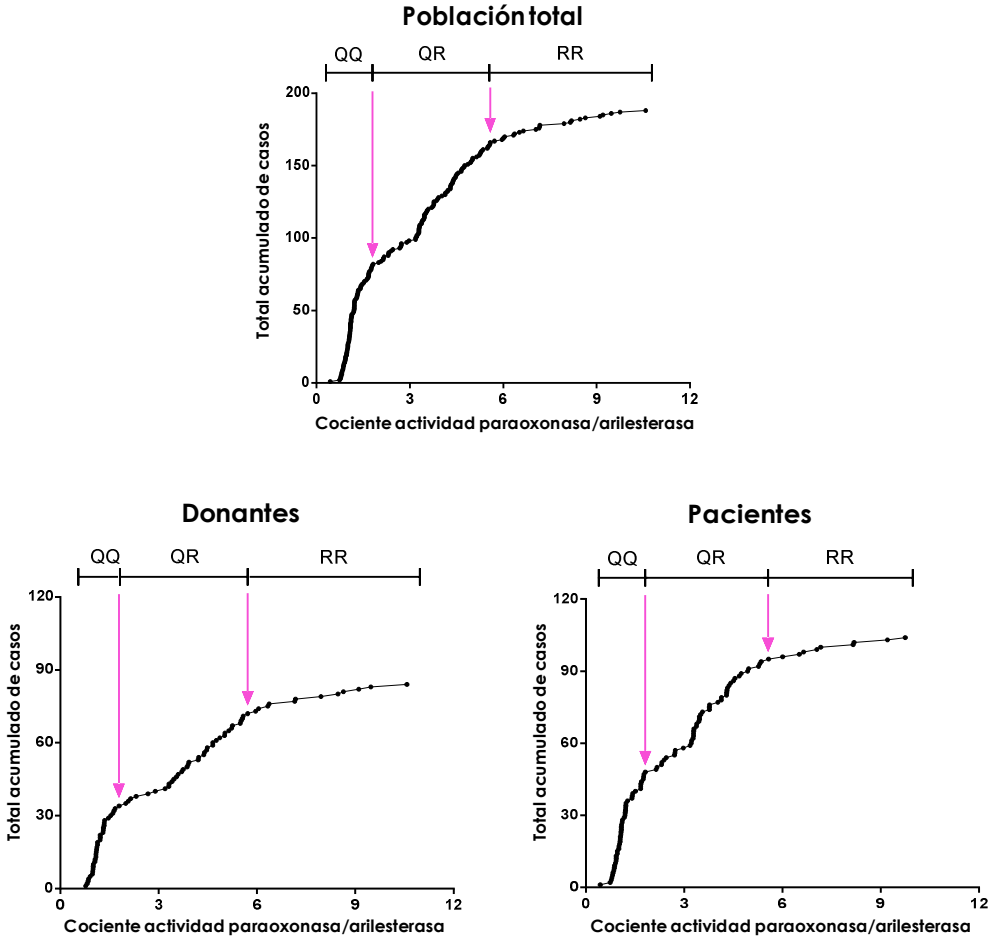
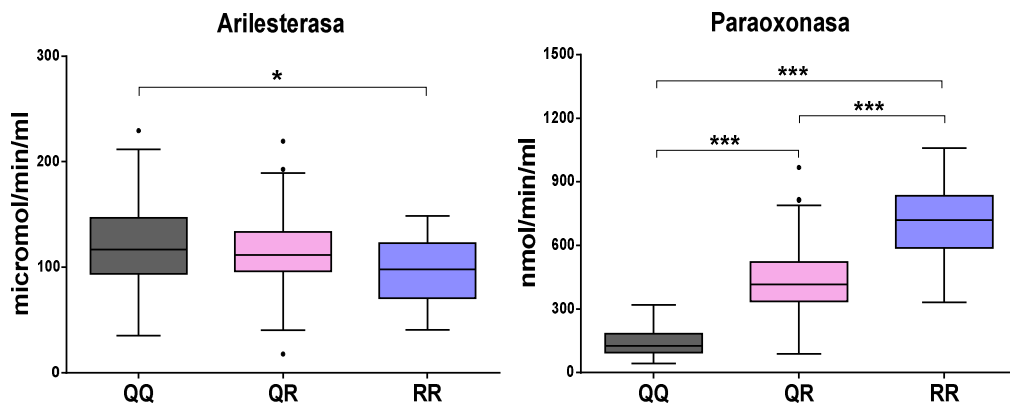


Figura 4.10. Distribución genotípica de la población de estudio con respecto al cociente paraoxonasa/arilesterasa.

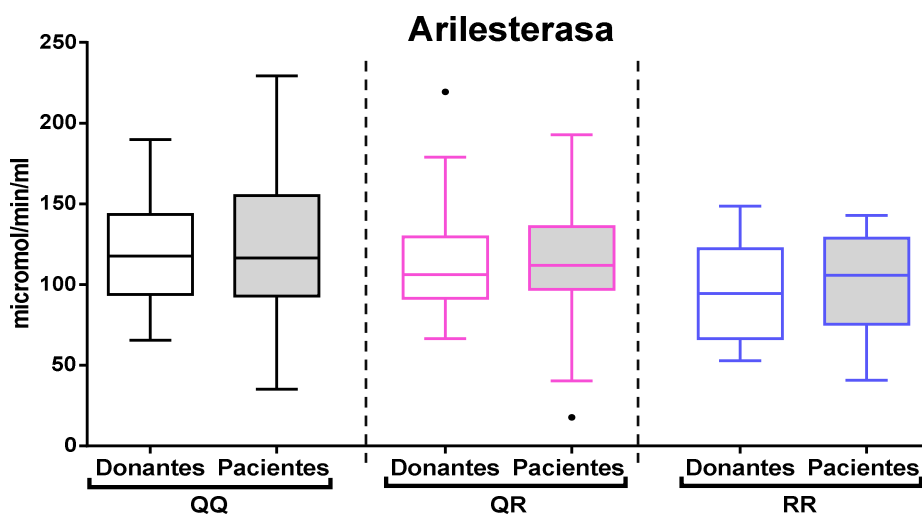
En la figura 4.11 se muestran las actividades arilesterasa y paraoxonasa en la población total en función del genotipo. El polimorfismo presenta una marcada influencia en la actividad paraoxonasa, aumentando la actividad según el orden  $QQ < QR < RR$ . En el caso de la actividad arilesterasa, la dependencia no es tan clara, existiendo diferencias significativas únicamente entre los genotipos QQ y RR. La actividad arilesterasa varió de forma opuesta a

la actividad paraoxonasa, decreciendo según el orden  $QQ > RR$ . No hubo diferencias significativas con el polimorfismo QR, si bien se observa una tendencia de la actividad según el orden  $QQ > QR > RR$ .



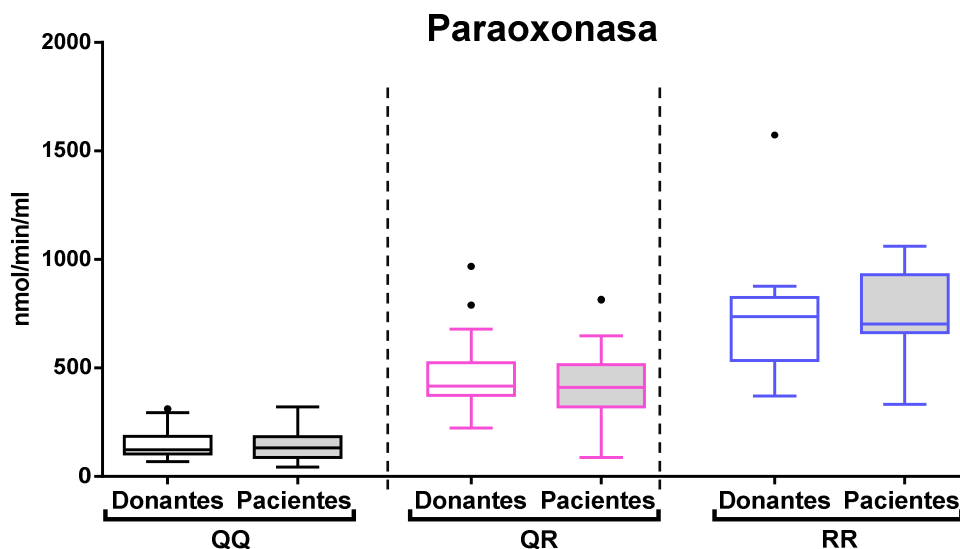
**Figura 4.11. Actividades paraoxonasa y arilesterasa según el polimorfismo PON1 Q192R.** Las actividades se determinaron en el LF de folículos grandes de la población total. Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A continuación analizamos los datos comparando las actividades arilesterasa y paraoxonasa entre Donantes y Pacientes teniendo en cuenta el polimorfismo PON1 Q192R.



**Figura 4.12. Actividad arilesterasa según el polimorfismo PON1 en Donantes y Pacientes.** Las actividades se determinaron en el LF de folículos grandes. Se muestran la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos.





**Figura 4.13. Actividad de paraoxonasa según el polimorfismo PON1 Q192R en Donantes y Pacientes.** Las actividades se determinaron en el LF de folículos grandes. Se muestra la mediana, los percentiles 25 y 75, y los valores extremos.

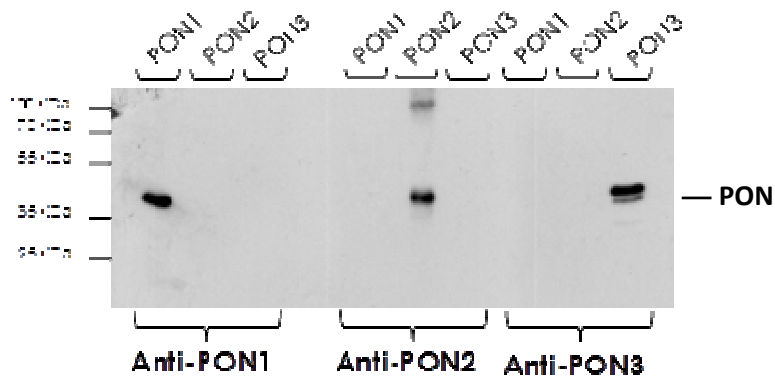
Como se puede observar en las figuras 4.12 y 4.13, no hay diferencias significativas entre ambos grupos poblacionales para ninguna de las dos actividades enzimáticas analizadas teniendo en cuenta el polimorfismo Q192R.

#### **DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PON1, PON2 Y PON3 EN EL LF**

Hemos cuantificado las tres proteínas de la familia PON en el LF mediante técnicas inmunoquímicas de transferencia Western, habiéndose utilizado anticuerpos frente a las proteínas PON1, PON2 y PON3.

En primer lugar analizamos la especificidad de los anticuerpos anti-PON1, anti-PON2 y anti-PON3 frente a las proteínas PONs. Para ello utilizamos las proteínas humanas recombinantes PON1, PON2 y PON3 expresadas en *E. coli*, que fueron adquiridas comercialmente.

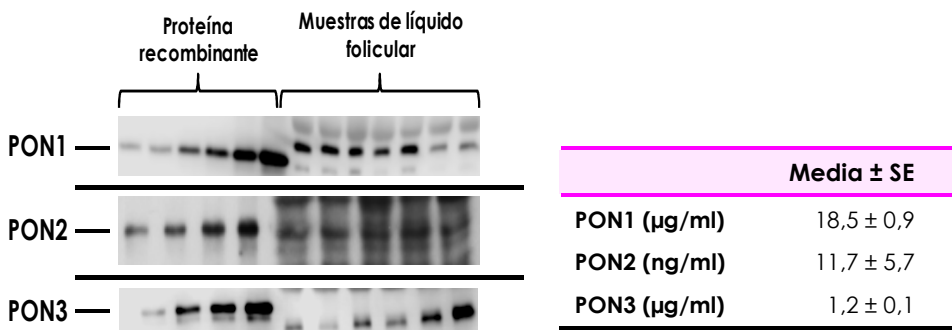
El ensayo reveló la presencia de una única banda correspondiente a cada una de las proteínas ensayadas, no existiendo especificidad cruzada (figura 4.14). En el caso de PON3 se observan dos bandas muy próximas entre sí, con un Pm próximo a 45 KDa.



**Figura 4.14. Especificidad de los anticuerpos primarios anti-PON1, anti-PON2 y anti-PON3 para las distintas proteínas PON.** Se cargaron en el gel 30 ng de cada proteína humana recombinante PON1, PON2 y PON3.

A continuación establecimos las condiciones óptimas para la cuantificación de las proteínas PON1, PON2 y PON3 en el LF. Como se indica en el apartado Materiales y Métodos, previamente al inmunoanálisis para identificar PON2, se eliminaron las proteínas más abundantes del LF mediante el procesamiento de las muestras con el kit comercial ProteoMiner. Comprobamos que este tratamiento previo del LF efectivamente disminuía de forma importante la cantidad de proteínas mayoritarias, entre ellas PON1 y PON3, y permitía concentrar la proteína PON2, menos abundante.

Para la cuantificación de las proteínas del sistema PON se construyeron curvas con concentraciones crecientes de las distintas paraoxonasas, utilizando como patrones las proteínas humanas recombinantes PON1, PON2 y PON3.



**Figura 4.15. Cuantificación de las proteínas PON1, PON2 y PON3 en líquido folicular.** Las proteínas se determinaron por transferencia Western, utilizando curvas de calibrado construídas con los patrones de las proteínas humanas recombinantes. PON2 se cuantificó después del procesamiento de las muestras del LF con el kit de enriquecimiento proteico ProteoMiner. Las muestras del LF corresponden a diferentes mujeres.

Se detectan bandas correspondientes a las proteínas PON (figura 4.15). Aunque PON1, PON2 y PON3 pertenecen a la misma familia de genes, hay diferencias en su peso molecular. En el caso de PON1, aparece una banda muy prominente con un Pm de 45 kDa, mayor que el del patrón (41 kDa); esta diferencia responde a modificaciones post-traduccionales extensas que sufre la proteína *in vivo* {{917 Marsillach, Judit 2010;}}. La banda de PON2 coincide con la del patrón (Pm de 42 KDa). En el caso de PON3, la proteína del LF tiene un Pm de 39 kDa, inferior al del patrón, debido a que la proteína recombinante tiene una cola adicional de His (His-tag) que le confiere un Pm mayor.

Los resultados revelan que la proteína PON1 es la más abundante, hallándose en una concentración aproximadamente 15 veces superior a la de PON3 y 1500 veces mayor que PON2.

#### **CUANTIFICACIÓN DE PON1 Y PON3 EN LF DE DONANTES Y DE PACIENTES**

Por otro lado, estudiamos si había diferencias de las concentraciones de PON1 y PON3 en el LF entre Donantes y Pacientes (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6. Concentraciones de PON1 y PON3 en LF de Donantes y Pacientes.**

	<b>Media ± SE</b>	
	<b>DONANTES</b>	<b>PACIENTES</b>
<b>PON1 (µg/ml)</b>	19,50 ± 1,38	17,80 ± 1,25
<b>PON3 (µg/ml)</b>	1,04 ± 0,12	1,28 ± 0,12*

Se muestran las concentraciones en el LF de folículos grandes. \*p<0,05, significativamente diferente entre Donantes y Pacientes (para la misma fila).

No existen diferencias en la concentración de PON1 entre el grupo de Donantes y Pacientes. Sin embargo, la concentración de PON3 es mayor en el LF procedente de Pacientes que de Donantes.

## 4.5 ESTUDIO DE CORRELACIONES DE LA COMPOSICIÓN Y ESTADO ANTIOXIDANTE DEL LF Y LOS PARÁMETROS DE FERTILIDAD

Se realizó el análisis estadístico de correlación de Pearson o de Spearman con el fin de estudiar posibles asociaciones entre los parámetros bioquímicos y del estado antioxidante del LF con los resultados de fertilidad tras un ciclo de estimulación ovárica en ambos grupos.

Los parámetros de fertilidad analizados fueron: número de folículos antrales, número de ovocitos totales y maduros y tasa de fertilización. Los parámetros bioquímicos analizados se detallan en las Tablas 4.8 y 4.9. En las figuras 4.16 y 4.17 se muestran las curvas de correlación de aquellas asociaciones que fueron significativas.

**Tabla 4.8. Correlaciones entre parámetros bioquímicos del LF y de fertilidad en el grupo de Donantes.**

	Nº Folículos antrales	Nº Ovocitos totales	Nº Ovocitos maduros	Tasa de fertilización
<b>Albúmina</b>	-0,405	-0,038	-0,344	-0,021
<b>Ácido úrico</b>	-0,233	0,135	0,013	0,003
<b>Apo-AI</b>	-0,002	0,369	0,299	-0,019
<b>Colesterol total</b>	-0,171	0,128	0,064	-0,189
<b>Glucosa</b>	0,226	0,239	0,082	0,039
<b>HDLc</b>	-0,063	0,209	0,145	-0,116
<b>Proteínas totales</b>	-0,521*	-0,030	-0,200	-0,132
<b>Triglicéridos</b>	-0,273	0,013	-0,151	-0,589**

\*p<0,05; \*\*p<0,01.

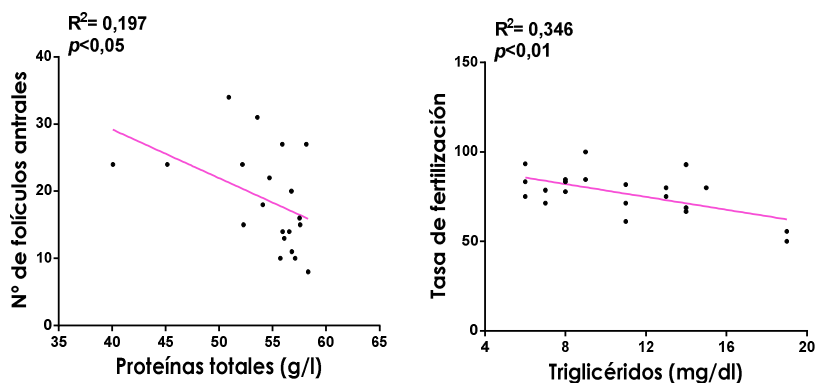


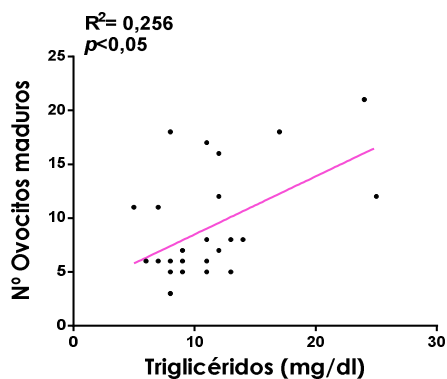
Figura 4.16. Correlaciones significativas de parámetros bioquímicos del LF y de fertilidad en el grupo de Donantes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En el grupo de Donantes todas las correlaciones estadísticamente significativas encontradas fueron negativas. Se correlacionan el número de folículos antrales con la concentración de proteínas totales, y la tasa de fertilización con las concentraciones y triglicéridos.

Tabla 4.9. Correlaciones de parámetros bioquímicos del LF y de fertilidad en el grupo de Pacientes.

	Nº Folículos antrales	Nº Ovocitos totales	Nº Ovocitos maduros	Tasa de fertilización
Albúmina	0,119	0,192	0,104	-0,301
Ácido úrico	0,232	0,250	0,289	-0,232
Apo-AI	0,128	0,031	0,064	-0,015
Colesterol total	0,099	0,019	0,046	0,104
Glucosa	0,114	0,239	0,274	0,107
HDLc	0,080	0,002	0,012	0,081
Proteínas totales	0,317	0,233	0,164	-0,235
Triglicéridos	0,131	0,251	0,399*	0,120

\* $p < 0,05$



**Figura 4.17. Correlación significativa de parámetros bioquímicos del LF y de fertilidad en el grupo de Pacientes. \* $p < 0,05$ .**

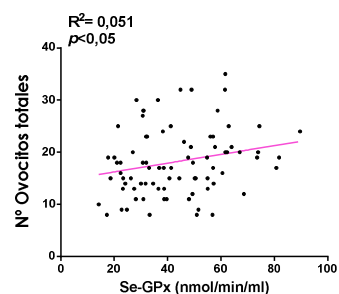
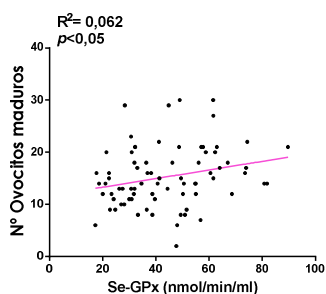
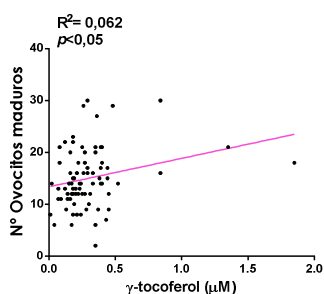
En el grupo de Pacientes la única correlación existente fue positiva entre el número de ovocitos maduros y la concentración de triglicéridos.

Así mismo, se analizaron las posibles asociaciones de los diferentes parámetros antioxidantes del LF con los parámetros de fertilidad tras un ciclo de estimulación ovárica. Los resultados se muestran en las Tablas 4.10 y 4.11. Las figuras 4.18 y 4.19 representan aquellas curvas de correlaciones que fueron significativas.

Tabla 4.10. Correlaciones de parámetros antioxidantes del LF y de fertilidad en el grupo de Donantes.

	Nº folículos antrales	Nº Ovocitos totales	Nº Ovocitos maduros	Tasa de fertilización
TAC	-0,251	0,020	-0,097	0,111
ORAC	-0,079	0,045	0,144	0,088
$\alpha$ -Tocoferol	0,076	0,049	0,081	-0,024
$\gamma$ -Tocoferol	0,231	0,215	0,250*	0,128
NO	0,122	-0,016	-0,002	-0,112
Catalasa	0,107	0,052	0,005	0,099
GPx total	0,154	0,131	0,160	0,029
Se-GPx	0,189	0,244*	0,288*	0,055
GST	0,010	-0,128	-0,014	-0,119
SOD	-0,124	-0,003	0,062	-0,038
Ariesterasa	0,011	0,310*	0,301**	-0,086
Paraoxonasa (-)	0,144	0,294**	0,188	-0,078
Paraoxonasa (+)	0,194	0,325**	0,215	-0,050
Metilparaoxonasa (-)	0,203	0,308*	0,237	-0,042
Metilparaoxonasa (+)	0,034	0,207	0,135	-0,271
Simvastatinasa	-0,153	0,212	-0,041	0,200

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



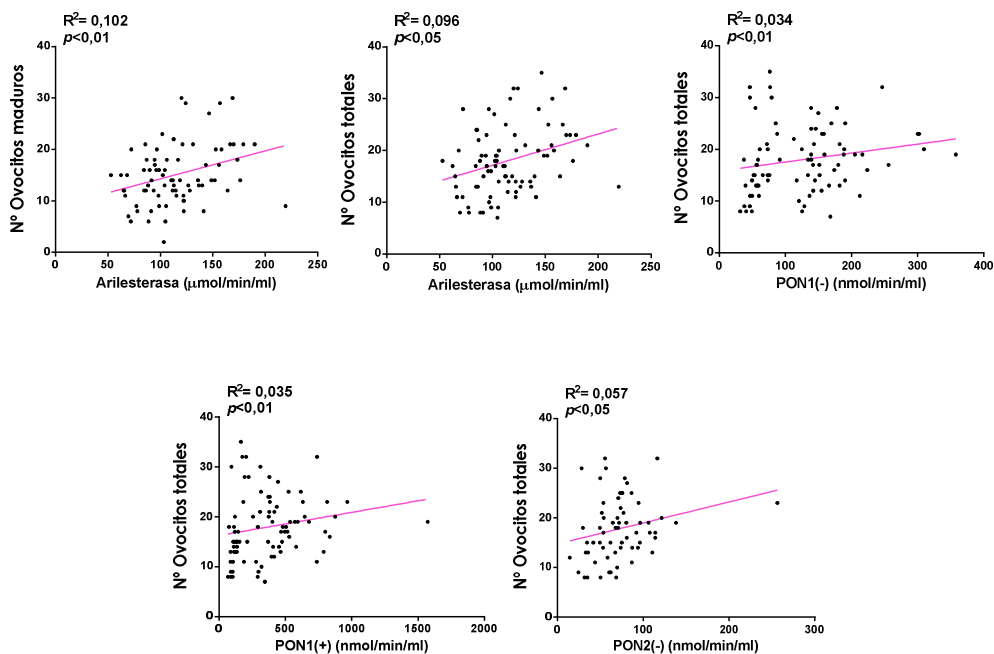


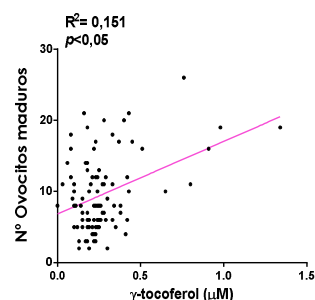
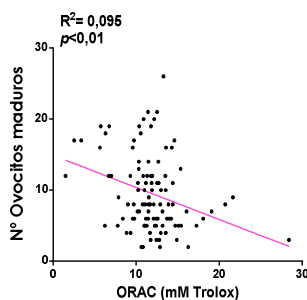
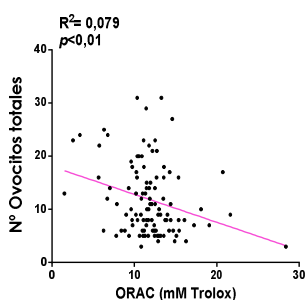
Figura 4.18. Correlaciones significativas de los parámetros antioxidantes del LF y de fertilidad en el grupo de Donantes. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

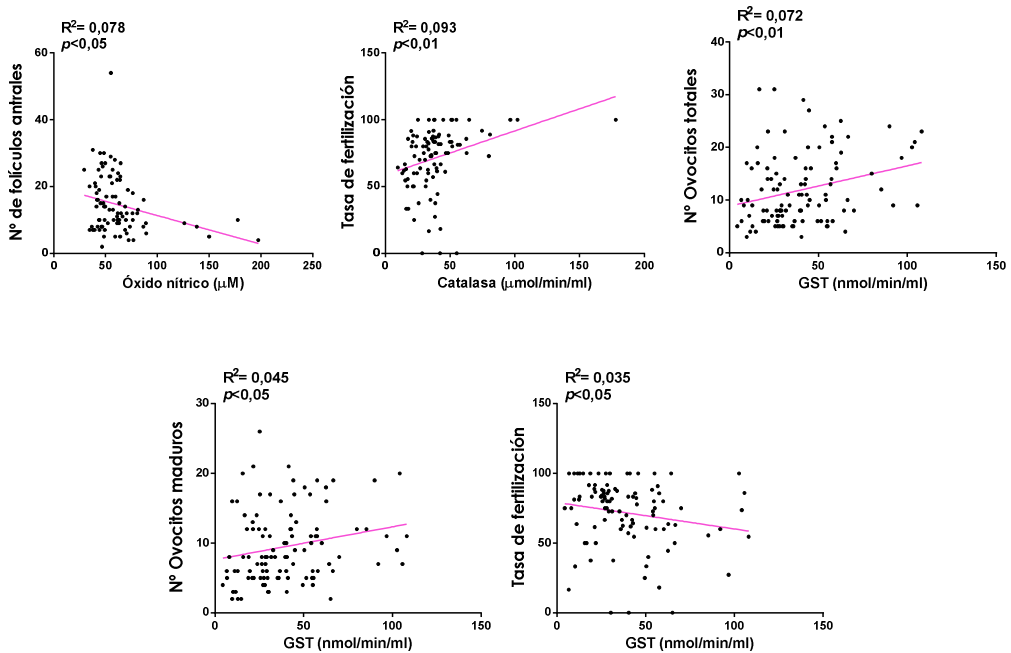
Para la población de Donantes destacamos las correlaciones positivas encontradas para el número de ovocitos totales y maduros con la actividad Se-GPx y las fuertes asociaciones positivas de estos dos parámetros de fertilidad con diversas actividades del sistema PON (arilesterasa, paraoxonasas y metilparaoxonasas).



Tabla 4.11, Correlaciones de parámetros antioxidantes y de fertilidad en el grupo de Pacientes,

	Nº folículos antrales	Nº Ovocitos totales	Nº Ovocitos maduros	tasa de fertilización
TAC	-0,088	-0,172	-0,161	0,012
ORAC	-0,134	-0,253**	-0,276**	-0,078
$\alpha$ -Tocoferol	-0,005	0,012	-0,005	-0,039
$\gamma$ -Tocoferol	0,118	0,197	0,200*	-0,130
NO	-0,241*	-0,031	0,007	0,020
Catalasa	0,010	-0,121	-0,145	0,381**
GPx total	0,020	0,112	0,102	-0,101
Se-GPx	-0,003	0,082	0,048	-0,170
GST	0,107	0,257**	0,248*	-0,253*
SOD	-0,049	-0,001	-0,002	0,024
Arilesterasa	0,126	0,023	0,052	-0,115
Paraoxonasa (-)	0,111	-0,009	0,036	-0,048
Paraoxonasa (+)	0,046	-0,012	0,037	-0,028
Metilparaoxonasa (-)	0,027	-0,051	-0,004	-0,018
Metilparaoxonasa (+)	0,135	0,028	0,081	-0,162
Simvastatina	-0,008	-0,049	-0,005	0,002

\* $p < 0,05$ .



**Figura 4.19. Correlaciones de parámetros antioxidantes del LF y de fertilidad en el grupo de Pacientes.**  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En el grupo de Pacientes destacamos las marcadas correlaciones halladas para el número de ovocitos totales y maduros con la actividad antioxidante total ORAC (correlaciones negativas,  $p < 0,01$ ) y con la actividad GST (correlaciones positivas,  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente). Así mismo, a diferencia de la población de Donantes que no fue significativa, en Pacientes vemos una fuerte correlación positiva entre la tasa de fertilización y la actividad catalasa del LF.

## 4.6 CICLOS PRODUCTIVOS VERSUS CICLOS NO PRODUCTIVOS

Como se ha descrito en el punto 4.2, el 47% de las pacientes consiguió con éxito un embarazo tras un ciclo de estimulación ovárica. A continuación analizamos y comparamos los diferentes parámetros bioquímicos y del estado antioxidante del LF en función de la obtención de embarazo.

Como se muestra en las tablas 4.12 y 4.13, no hay diferencias significativas de los parámetros analizados entre ciclos productivos y no productivos.

**Tabla 4.12. Parámetros bioquímicos del LF en función de la obtención del embarazo.**

	<i>Media ± SE</i>	
	<b>OBTENCION DE EMBARAZO</b>	
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>Albúmina (g/l)</b>	34,8 ± 1,1	37,8 ± 2,2
<b>Ácido úrico (mg/dl)</b>	4,2 ± 0,2	3,5 ± 0,4
<b>Apo-AI (mg/dl)</b>	102,5 ± 5,8	122,9 ± 9,4
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	28,5 ± 1,7	34,2 ± 3,9
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	43,6 ± 3,2	45,5 ± 2,7
<b>HDLc (mg/dl)</b>	25,3 ± 1,6	31,2 ± 3,4
<b>Proteínas totales(g/l)</b>	53,4 ± 1,7	56,4 ± 3,7
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	12,7 ± 1,6	10,5 ± 1,4

**Tabla 4.13. Estado antioxidante del LF en función de la obtención de embarazo.**

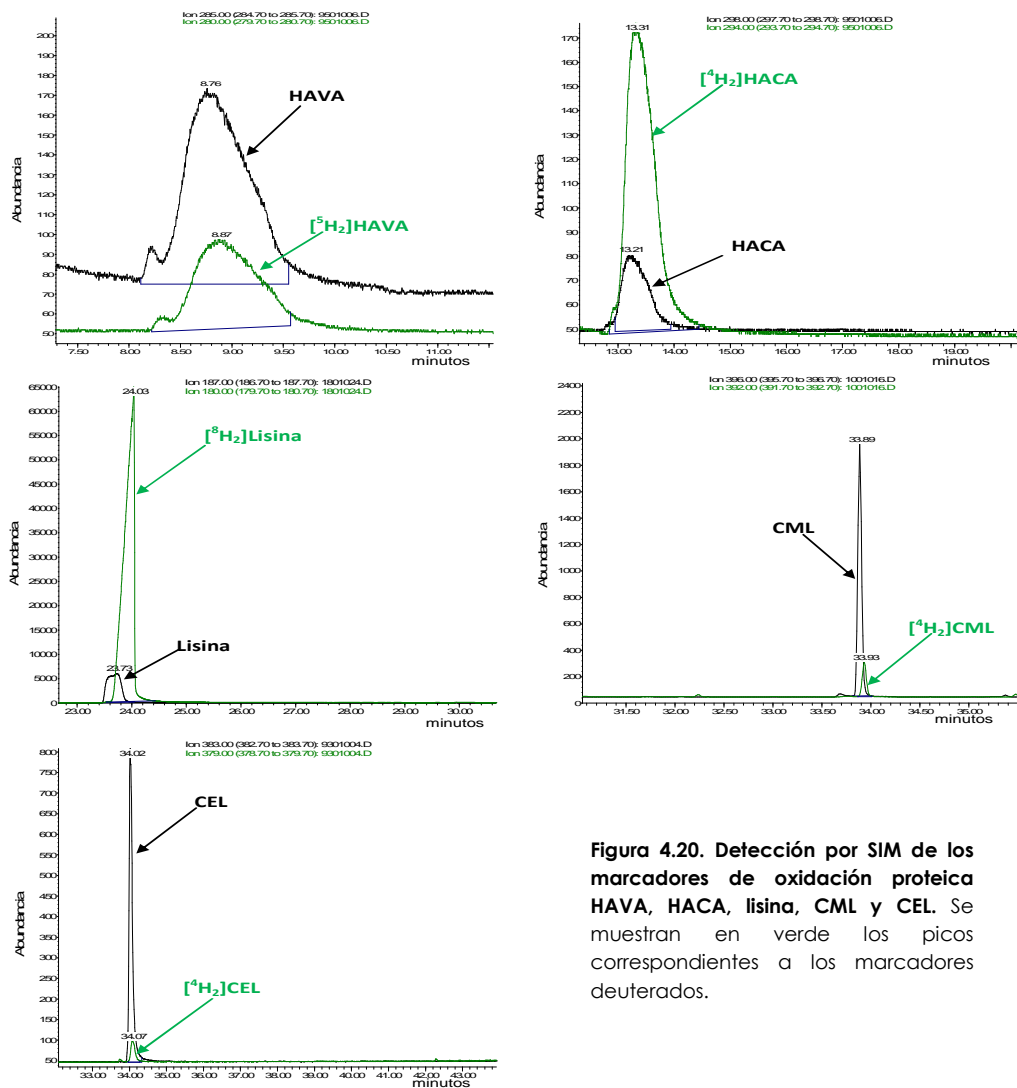
	<b>Media ± SE</b>	
	<b>OBTENCION DE EMBARAZO</b>	
	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>TAC (mM Trolox)</b>	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1
<b>ORAC (mM Trolox)</b>	11,7 ± 0,5	11,4 ± 0,5
<b>α-Tocoferol (μM)</b>	4,6 ± 0,3	4,9 ± 0,3
<b>γ-Tocoferol (μM)</b>	0,29 ± 0,03	0,27 ± 0,03
<b>NO (μM)</b>	64,0 ± 4,4	62,8 ± 4,5
<b>Catalasa (μmol/min/ml)</b>	35,3 ± 2,3	42,1 ± 4,0
<b>GPx total (nmol/min/ml)</b>	55,1 ± 3,5	52,1 ± 3,5
<b>GPx-Se (nmol/min/ml)</b>	47,1 ± 3,2	44,6 ± 3,3
<b>GST (nmol/min/ml)</b>	39,4 ± 3,2	39,8 ± 3,7
<b>SOD (U/ml)</b>	12,2 ± 0,9	13,2 ± 1,2
<b>Ariesterasa (μmol/min/ml)</b>	119,1 ± 5,9	118,1 ± 5,4
<b>Paraoxonasa (-) (nmol/min/ml)</b>	113,7 ± 11,0	118,5 ± 12,5
<b>Paraoxonasa (+) (nmol/min/ml)</b>	346,6 ± 36,9	312,6 ± 34,5
<b>Metilparaoxonasa (-) (nmol/min/ml)</b>	71,6 ± 6,8	69,3 ± 5,3
<b>Metilparaoxonasa (+) (nmol/min/ml)</b>	123,2 ± 11,0	129,1 ± 11,7
<b>Simvastatinasa (nmol/min/ml)</b>	13,1 ± 0,6	13,6 ± 0,8

## 4.7 MODIFICACIONES OXIDATIVAS PROTEICAS

El primer objetivo que se ha marcado en este estudio fue la puesta a punto de la metodología para cuantificar marcadores de daño oxidativo proteico *in vivo* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con monitorización selectiva de iones (SIM). Para ello, se optimizaron las distintas etapas del procedimiento: deslipidación, hidrólisis de proteínas, derivatización y detección de los compuestos a analizar.

Se construyeron curvas de calibrado a partir de patrones comerciales de GSA, AASA, CML, CEL y de lisina para obtener datos cuantitativos.

En la figura 4.20 se muestran los cromatogramas representativos de los distintos marcadores.



**Figura 4.20. Detección por SIM de los marcadores de oxidación proteica HAVA, HACA, lisina, CML y CEL. Se muestran en verde los picos correspondientes a los marcadores deuterados.**

Con el sistema cromatográfico utilizado los tiempos de retención de los compuestos siguen el orden HAVA<HACA<lisina<CML<CEL, durante un tiempo de corrido máximo de 45 min.

Se prepararon curvas de calibrado con cantidades crecientes de los patrones no deuterados en presencia de una cantidad constante del correspondiente compuesto deuterado. En el caso de GSA y AASA se utilizaron como patrones HAVA y HACA; esto es debido a que como consecuencia de los procesos de reducción e hidrólisis ácida que se dan durante el procesamiento de las muestras, GSA y AASA sufren una serie de modificaciones que dan lugar a los compuestos HAVA y HACA, respectivamente.

En la Tabla 4.14 se indica el rango de cada marcador utilizado para construir las curvas de calibrado.

**Tabla 4.14. Rangos utilizados en las curvas de calibrado**

	<b>nmol</b>
<b>Lisina</b>	0-750
<b>HAVA</b>	0-0,375
<b>HACA</b>	0-0,300
<b>CEL</b>	0-0,294
<b>CML</b>	0-0,340

En la figura 4.21 se muestran las rectas representativas que se obtuvieron para cada marcador. En ellas se representa el incremento del cociente entre el área del pico del compuesto no deuterado y el área del mismo compuesto deuterado, obtenidos en el cromatograma, frente a la cantidad de marcador utilizada.

Los datos se ajustaron a modelos de regresión lineal, siendo el coeficiente de correlación  $R^2 > 0,996$ .

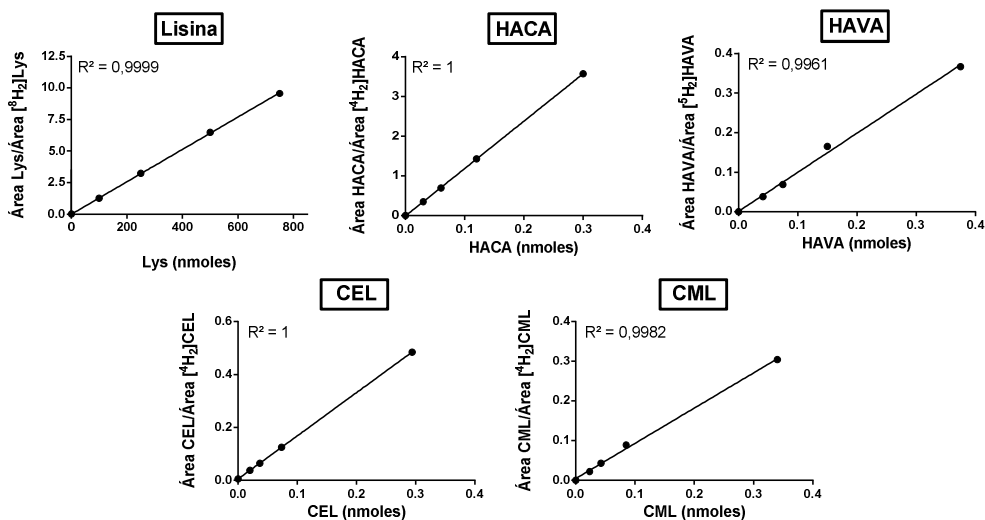


Figura 4.21. Curvas de calibración de los marcadores de oxidación proteica.

En los experimentos realizados con las muestras de LF se utilizaron como patrones internos los marcadores deuterados. Los datos que se obtienen del cromatograma se normalizaron con el contenido de residuos de lisina en la muestra (nmol Lys).

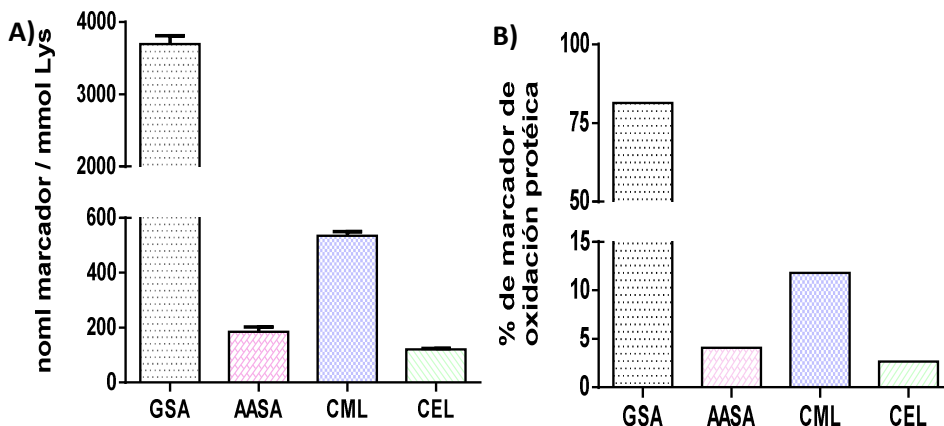


Figura 4.22. Marcadores de oxidación de proteínas del LF. A) Se expresa la cantidad de cada marcador por mmol de lisina presente en la muestra. Los valores corresponden a la media + error estándar. B) Se expresa el porcentaje de cada marcador respecto al total (suma de los 4 marcadores),

En la figura 4.22 se muestran los valores medios de los productos de la oxidación proteica obtenidos para la población total.

Las proteínas del LF contienen productos de la oxidación catalizada por metales, de la glicoxilación y la lipoxidación, ya que en todas las muestras analizadas se encontraron los cuatro marcadores de oxidación. El análisis de su distribución revela que los productos más abundantes derivan de la oxidación catalizada por metales: GSA y AASA (el 86% de todos los marcadores analizados). GSA constituye la lesión proteica más abundante (81% del total), suponiendo una media de 3,7 residuos alterados por cada 1000 lisinas. Los niveles de los demás biomarcadores analizados fue un orden de magnitud menor que los de GSA, alcanzando valores entre 0,12 y 0,5 residuos dañados por cada 1000 lisinas. La cantidad de CML, marcador de oxidación proteica por procesos de glicoxilación y lipoxidación, corresponde a un 12 % de las lesiones proteicas totales y es mayor que las lesiones de AASA (4%) y CEL (3%).

A continuación, analizamos si existían diferencias significativas de los marcadores de oxidación proteica entre las mujeres Donantes y las Pacientes. Los resultados se muestran en la figura 4.23.

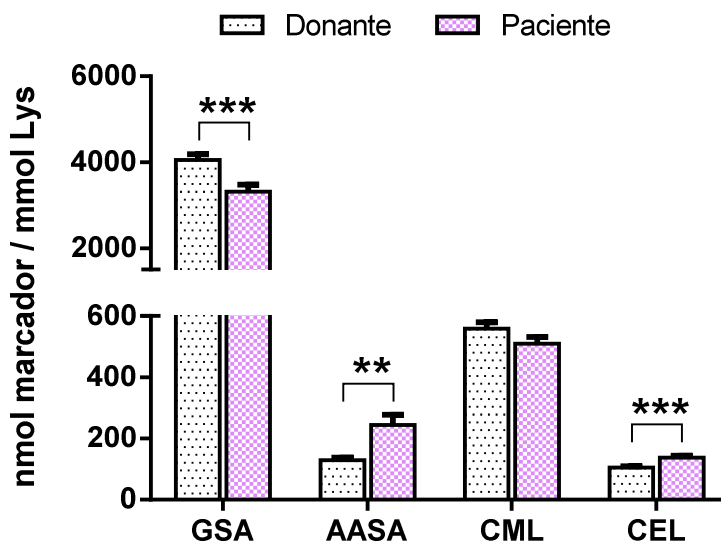


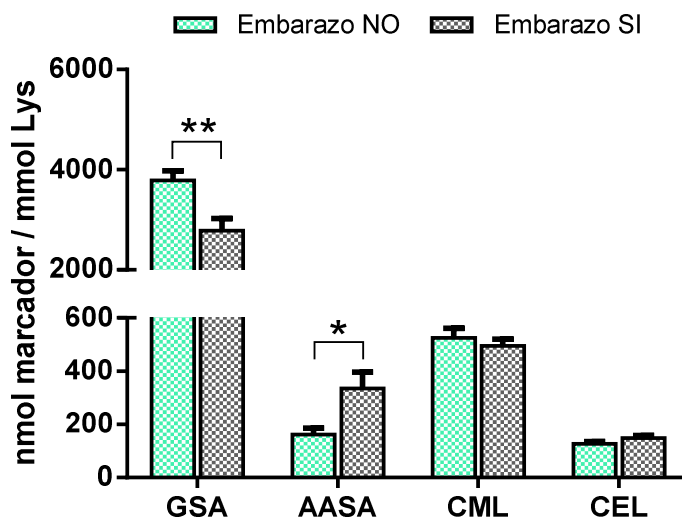
Figura 4.23. Marcadores de oxidación de proteínas del LF de Donantes (N=48) y Pacientes (N=44). Se representan las medias + el error estándar. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Se aprecian diferencias significativas en 3 de los cuatro marcadores estudiados: GSA, AASA y CEL. La cantidad del marcador de oxidación proteica GSA es mayor en el grupo de Donantes que en el de Pacientes. Por el



contrario, en este grupo los niveles de AASA y CEL son significativamente menores. Los valores de CML son similares en ambos grupos.

A continuación, analizamos si para el grupo de pacientes existían diferencias en función de la consecución de embarazo tras un ciclo de estimulación ovárica (figura 4.24).



**Figura 4.24.** Marcadores de oxidación proteica en líquido folicular de Pacientes que obtuvieron embarazo (N=23) y que no lo obtuvieron (N=21). Se representan las medias + el error estándar, (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Se observa que los ciclos productivos se asocian a valores significativamente más bajos del marcador de oxidación GSA y mayores del marcador AASA. No se observan diferencias en los otros marcadores.









## *DISCUSIÓN*











## 5. DISCUSIÓN

La infertilidad es un problema sociológico que en los países industrializados afecta a unas 1200 parejas por cada millón de habitantes y año. Aproximadamente una de cada cuatro a seis parejas encuentra dificultades para concebir (Organización Mundial de la Salud 2016) (Chow y cols., 2016), siendo uno de los principales factores del descenso de la capacidad reproductiva de la mujer el retraso de la maternidad. La situación se ha agravado con la crisis económica, que ha hecho que las parejas decidan procrear cuando consiguen una independencia económica y un cierto grado de estabilidad laboral, con el consiguiente retraso que ello conlleva. Las mujeres infértiles están sometidas a una gran tensión emocional, de forma que el estrés asociado a intentar concebir y la presión social asociada a la incapacidad de tener descendencia a menudo conllevan un trastorno psicológico en la mujer. La introducción de las técnicas de reproducción asistida ha aumentado las posibilidades de tratamiento efectivo, convirtiéndose en una opción básica para las parejas con problemas de fertilidad. Hoy en día, debido tanto a su capacidad terapéutica como a los resultados alcanzados, la técnica más utilizada es la fecundación *in vitro*, siendo la estimulación ovárica controlada una fase fundamental para la consecución de embarazo.

La estimulación ovárica en la FIV provoca el desarrollo de los folículos. A medida que crece el folículo el líquido folicular se acumula entre las células de la granulosa, adquiriendo una gran importancia. El líquido folicular puede considerarse como una ventana biológica que refleja los procesos metabólicos y hormonales que ocurren en el microambiente del ovocito en maduración antes de la ovulación. Algunas características bioquímicas del líquido folicular pueden desempeñar un papel crítico en la determinación de la calidad del ovocito y el consiguiente potencial para lograr la fertilización y el desarrollo del embrión (Basuino y Silveira, 2016).

Habitualmente se utiliza el tamaño folicular y la concentración sérica de estradiol como indicadores de la maduración ovocitaria. Se ha descrito que en

la FIV ovocitos procedentes de folículos grandes tienen una mayor tasa de fertilización que los de folículos pequeños (*Wittmaack y cols., 1994; Bergh y cols., 1998; Dubey y cols., 1995; Miller y Rivier, 1996; Andersen, 1993; Ectors y cols., 1997*). El líquido folicular de folículos grandes es distinto en su naturaleza y composición bioquímica del de folículos pequeños, como se ha demostrado por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) (*Thomas y cols., 2000*). A diferencia del líquido folicular de folículos grandes, el de folículos pequeños es heterogéneo, reflejando diferencias en el estado de maduración de los folículos antrales. Estas diferencias probablemente tienen consecuencias en el desarrollo del ovocito.

En este trabajo de tesis doctoral se describen los parámetros bioquímicos, el estado antioxidante y las modificaciones oxidativas proteínicas del líquido folicular de mujeres fértiles (Donantes) y subfértiles (Pacientes) que se han sometido a un ciclo de estimulación ovárica controlada. Hemos estudiado la posible implicación de estos marcadores en la maduración folicular y en los parámetros de fertilidad.

Una limitación del estudio es que para llevar a cabo los análisis de los distintos parámetros hemos utilizado una mezcla del líquido folicular procedente de varios folículos del mismo tamaño (dos folículos contralaterales), lo que podría conllevar la pérdida de la supuesta variabilidad entre folículos individuales (*Bloom y cols., 2014*). Sin embargo, en todos los casos las muestras provenían del mismo número de folículos y, además, las actividades enzimáticas analizadas tienen una variabilidad entre folículos menor entre mujeres. Una ventaja del trabajo es que cada muestra de folículos grandes y pequeños procede de la misma mujer, de forma que el análisis estadístico para comparaciones entre folículos de distinto tamaño se ha realizado para datos pareados, reduciendo así la variabilidad de los valores medios que se obtienen cuando se utilizan grupos independientes con diferentes sujetos.

Respecto a los componentes bioquímicos del líquido folicular, en nuestro estudio hemos observado que los niveles de albúmina, ácido úrico, apo-AI, HDLc y proteínas totales aumentan al aumentar el tamaño folicular en el grupo

de Pacientes. Estos resultados sugieren que en la foliculogénesis aumenta la permeabilidad de la barrera sanguínea folicular, permitiendo el paso de los componentes más pequeños desde la sangre al líquido folicular. En el grupo de Donantes solamente observamos aumento de la concentración de ácido úrico. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las células de la granulosa y de la teca secretan al fluido que las rodea proteínas sintetizadas localmente (*Lobb y Dorrington, 1987*).

La albúmina, además de tener un papel clave en la regulación osmótica del plasma y de actuar como principal transportador de moléculas hidrofóbicas, participa en el mantenimiento del estado antioxidante de los fluidos extracelulares (*Otsuki y cols., 2012*). Así, es la fuente principal de grupos tioles en el suero (*Radi y cols., 1991*). Funciona también como eliminador de radicales libres, habiéndose descrito una correlación positiva entre TAC/ORAC y la concentración de albúmina en la sangre (*Miller y cols., 1997; Cao y cols., 1993*). En concordancia con estos resultados, nosotros hemos constatado que en el grupo de Pacientes existe una correlación positiva significativa ( $p < 0,05$ ) entre la concentración de albúmina y las actividades antioxidantes TAC y ORAC en el líquido folicular de folículos pequeños (datos no mostrados). La albúmina intrafolicular podría, además, participar en el transporte de metabolitos implicados en el crecimiento folicular y en la transferencia a la circulación general de algunos productos específicos del folículo, como las hormonas esteroideas (*Schussler, 2000; Dea y cols., 2002*).

El ácido úrico se produce por la degradación de nucleótidos purínicos. Como se ha mencionado anteriormente, en ambos grupos poblacionales (Donantes y Pacientes) la concentración de este compuesto aumentó a medida que aumentó el tamaño folicular. Estos resultados concuerdan con lo descrito por *Wen y cols., 2009*, quienes observaron una correlación positiva con el diámetro folicular. Este aumento podría deberse a una transferencia del ácido úrico a través de los capilares sanguíneos al folículo ovárico, aunque diversos estudios han descrito que la concentración de ácido úrico en el líquido folicular es mucho mayor que en el suero (*Wen y cols., 2009; Stewart y cols., 2001; Perrett, 1999*).

La glucosa en el líquido folicular juega un papel en el desarrollo del ovocito, pudiendo afectar a la tasa de fertilización del mismo. En nuestros resultados, independientemente del tamaño folicular, los niveles de glucosa fueron más bajos en el grupo de Pacientes que en el de Donantes. Hay que considerar que la concentración de glucosa en el líquido folicular varía en función de la edad de la mujer, habiéndose descrito que es significativamente mayor en mujeres de edad reproductiva joven (<35 años) que en mujeres con edad reproductiva avanzada ( $\geq 40$  años). En nuestro estudio el grupo de Pacientes presentó una edad media significativamente mayor que la de Donantes. Por otra parte, se ha visto que en mujeres con reserva ovárica reducida los niveles de glucosa en el líquido folicular se encuentran disminuidos con respecto a mujeres de la misma edad con reserva ovárica normal (*Pacella y cols., 2012*). Los autores determinaron que las concentraciones bajas de glucosa se asociaban a niveles elevados de lactato y que estos cambios reflejaban un perfil metabólico alterado de las células de la granulosa y del cúmulo. Estas células captan más glucosa que se convierte en lactato por la glucólisis anaerobia, aumentando la concentración de lactato en el líquido folicular. Los autores sugieren que el aumento de la producción de lactato puede dar lugar a una disminución del pH y un pH bajo se relaciona con la reducción de la fertilización de ovocitos (*Dale y cols., 1998*). Nosotros hemos visto, además, que las proteínas del líquido folicular de Pacientes presentan un aumento significativo de CEL, marcador de lesión proteica por procesos derivados de la oxidación de la glucosa. Quizás esta observación esté relacionada con los valores disminuidos de glucosa en el líquido folicular de Pacientes al sufrir en mayor grado procesos de oxidación.

En el líquido folicular hemos comprobado que la mayor parte del colesterol se encuentra asociada a las HDL (HDLc); procede principalmente de la sangre por difusión. Está establecido que en la transferencia de HDL desde el compartimento sanguíneo al folículo ovárico están involucradas SR-BI y ABCG1 (*Fujimoto y cols., 2010*). Las HDL del líquido folicular contienen menos colesterol, pero son más ricas en fosfolípidos en comparación con las del suero (*Jaspard y cols., 1997*). Apo-AI es el principal componente proteico de las HDL (*Fujimoto y cols., 2010*) y en nuestro estudio hemos encontrado una fuerte correlación positiva entre la concentración de apo-AI y HDLc en las muestras de líquido

folicular en ambas poblaciones, independientemente del tamaño del folículo (datos no mostrados).

La apo-AI también es sintetizada por las células del cúmulo y podría estar involucrada en el crecimiento de los ovocitos, facilitando la transferencia y la redistribución de los lípidos (Choi y cols., 2010). Además, se ha sugerido que apoA-I protege a los ovocitos de la oxidación lipídica y promueve el potencial de fertilización (Von Wald y cols., 2010). En nuestro estudio hemos determinado que en el grupo de Pacientes están disminuidos significativamente los niveles foliculares de apo-AI respecto a los de mujeres control. La disminución de apo-AI podría contribuir al aumento de estrés oxidativo en el líquido folicular y afectar a la obtención de ovocitos de buena calidad.

Por otro lado, las HDL son las principales transportadoras de la vitamina E a los tejidos. Aunque el  $\gamma$ -tocoferol es la forma mayoritaria de la vitamina E en la dieta, el procesamiento hepático de la vitamina E incorpora de forma selectiva el  $\alpha$ -tocoferol en las lipoproteínas, lo que conlleva un aumento de la excreción de  $\gamma$ -tocoferol por la bilis. Ello se debe al metabolismo de la vitamina E. Ésta se absorbe en el intestino y se incorpora en quilomicrones. Después de entrar en la circulación, la vitamina E asociada a los remanentes de quilomicrones es transportada al hígado, donde el isómero alfa se incorpora a las VLDL por la proteína de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol hepática, volviéndose a secretar al torrente sanguíneo. Posteriormente, las VLDL intercambian  $\alpha$ -tocoferol con las HDL. Por último, la vitamina E se excreta principalmente por la bilis (Lemaire-Ewing y cols., 2010). Nuestros resultados indican que la concentración del isómero alfa en el líquido folicular es 15 veces superior a la del isómero gamma. En un estudio paralelo hemos determinado las concentraciones de  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol simultáneamente en muestras de suero y de líquido folicular para una misma mujer tras un ciclo de estimulación ovárica (N=16). Hemos encontrado que en el suero esta diferencia es de unas 24 veces ( $\alpha$ -tocoferol  $21,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$ , y  $\gamma$ -tocoferol  $0,89 \pm 0,15 \mu\text{M}$ ). Estos datos indicarían que las células ováricas están utilizando en mayor proporción el isómero alfa, lo que se refleja en un cociente alfa-tocoferol/gamma-tocoferol menor en el líquido folicular, y sugieren un papel protector del  $\alpha$ -tocoferol frente al daño oxidativo en estas células. En la

bibliografía se ha descrito que los niveles intrafoliculares de  $\alpha$ -tocoferol se correlacionan negativamente con la fragmentación embrionaria durante la FIV, sugiriéndose un papel de éste isómero en el desarrollo ovocitario (Browne y col., 2009).

Recientemente se ha descrito una glicoproteína plasmática con propiedades de unión a la vitamina E: la afamina. La afamina pertenece a la familia génica de la albúmina, se expresa principalmente en el hígado, se secreta a la sangre y se distribuye posteriormente a los respectivos fluidos extravasculares (Jerkovic y cols., 2005). El análisis cualitativo y cuantitativo del plasma y líquidos extravasculares reveló una presencia abundante de esta proteína no sólo en el plasma, sino también en fluidos como el líquido folicular y el líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere un posible papel de la afamina en la fertilidad y la neuroprotección. La afamina está parcialmente unida a las lipoproteínas plasmáticas. Las concentraciones de afamina y de vitamina E se correlacionan significativamente en el líquido folicular y cefalorraquídeo, pero no en el plasma. Se ha visto, además, que mujeres con preeclampsia, situación asociada a un incremento de ROS, mostraron concentraciones medias de afamina significativamente mayores que las mujeres con embarazo sin complicaciones (Hubalek y cols., 2014). Una menor utilización de la vitamina se reflejaría en un aumento de su concentración en los fluidos extracelulares. En nuestro estudio hemos observado concentraciones más altas de alfa-tocoferol en el líquido folicular de Pacientes, independientemente del tamaño folicular. Estos datos sugieren una menor utilización de esta forma de vitamina E por las células ováricas y su posible implicación en la fertilidad..

En este trabajo hemos descrito que al aumentar el tamaño folicular durante la maduración aumentan los niveles de NO en el líquido folicular tanto en Donantes como en Pacientes. Se ha establecido que el NO es un modulador intra e intercelular en numerosos procesos biológicos, como la vasodilatación y la apoptosis (Brown, 2007). Diversos estudios demuestran la presencia de un sistema generador de NO en el ovario (células de la granulosa, de la teca, ovocito) de distintas especies y su presencia en líquido folicular, lo que enfatiza la función de esta molécula en el control de la fisiología ovárica (Tamanini y

cols., 2003). Así, el NO está implicado en la maduración folicular y en la ovulación (Basini y Grasselli, 2015). El NO podría proceder de la síntesis local de las células ováricas, en particular células de la granulosa, puesto que se ha detectado por inmunocitoquímica óxido nítrico sintasa en dichas células en estudios con animales (Zamberlam y cols., 2011). Anteby y cols. 1996, determinaron que la concentración de NO en el líquido folicular de mujeres sometidas a un programa de fertilización *in vitro* aumenta a medida que aumenta el volumen del folículo (Anteby y cols., 1996), lo que concuerda con nuestros resultados. Además se ha observado que la expresión de los RNAm de las distintas isoformas de NOS podría estar sujeta a regulación por gonadotropinas (Van Voorhis y cols., 1995; Matsumi y cols., 2000). El aumento de la concentración folicular de NO puede estimular el crecimiento folicular activando la guanilato ciclasa (enzima que genera GMP cíclico, principal mediador de la señalización por NO) o potenciando la vasodilatación en el ovario (Goud y cols., 1999).

Un logro importante de este trabajo es que por primera vez se han cuantificado las proteínas del sistema PON y determinado las actividades enzimáticas de PON1, PON2 y PON3 en líquido folicular humano. En particular, se han analizado las actividades paraoxonasa y arilesterasa de PON1, metilparaoxonasa (principal actividad de PON2) y simvastatinasa de PON3. De las cuatro actividades analizadas la arilesterasa fue la más alta (cerca de tres órdenes de magnitud mayor que las otras). Se han descrito en la bibliografía diferencias similares en las actividades PON1 arilesterasa y paraoxonasa en suero humano; en estos trabajos la actividad arilesterasa se expresa a menudo en kU/l, mientras que la paraoxonasa en U/l (Schulpis y cols., 2008; Browne y cols., 2008; Rainwater y cols., 2009; Hashemi y cols., 2011; Cerit y cols., 2014). Cabe destacar que la actividad metilparaoxonasa en nuestro estudio fue relativamente alta (en un rango similar a la paraoxonasa). PON2 tiene preferencia por el sustrato metilparaoxón, pero PON1 también posee actividad metilparaoxonasa (Bar-Rogovsky y cols., 2013).

PON1 y PON3 son enzimas secretadas a la circulación asociadas a las HDL. Utilizando una aproximación proteómica Angelucci y cols. 2006 identificaron



PON1 y otras proteínas con actividades antioxidantes en cantidades relativamente altas en el líquido folicular de mujeres con ciclos ovulatorios espontáneos (*Angelucci y cols., 2006*). Los autores sugieren que estas enzimas probablemente contribuyen a la protección del folículo frente al estrés oxidativo durante la ovulación. Recientemente se ha reportado la expresión de las tres isoformas de PON en células de granulosa de vacas lecheras (*Schneider y cols., 2013*) y acaba de publicarse un estudio del análisis proteómico del líquido folicular de mujeres sometidas a un ciclo FIV con baja respuesta al tratamiento (*Oh y cols., 2017*); en dicho trabajo se han detectado en el líquido folicular, entre otras, las proteínas antioxidantes PON1 y PON3. Nosotros hemos determinado las concentraciones de PON1 y PON3 en el líquido folicular y hemos constatado que PON1 se encuentra en una concentración 15 veces superior a PON3. Por otro lado, PON2 es un enzima intracelular. En el líquido folicular hemos detectado también la proteína PON2 por transferencia Western. Al ser PON2 una proteína intracelular (*Rajkovic y cols., 2011*) fue necesario un paso previo de enriquecido del fluido en proteínas minoritarias. La concentración de PON2 fue unas 1.500 veces menor que PON1. Por ello pensamos que la actividad intrafolicular metilparaoxonasa detectada se debe al enzima PON1 y no a PON2.

La actividad PON3 simvastatinasa que hemos determinado es aproximadamente 15 nmol/min/ml de líquido folicular. Hemos seguido el método original descrito por *Suchocka y cols. 2006*, utilizando las mismas condiciones de la reacción y detección del producto por HPLC (*Suchocka y cols., 2006*). Sin embargo, estos autores reportan una actividad PON3 simvastatinasa en suero humano de 16 pmol/min/ml, unas 1.000 veces menor que en nuestro estudio. El grupo de *Browne y cols. 2008*, siguiendo el mismo método, refirió actividades PON3 simvastatinasa en suero (10,6 pmol/min/ml) y en líquido folicular (16,5 pmol/min/ml) también del mismo orden (*Browne y cols., 2008*). El análisis en detalle del protocolo del método original nos lleva a considerar que las unidades de la actividad PON3 publicadas en ambos artículos son erróneas. De hecho, de acuerdo con las curvas de calibración y el límite de detección que se describen en el método, las actividades reportadas deberían ser mucho más altas. En nuestro sistema la curva de calibración se

construyó con el producto de la reacción (simvastatina ácida, SVA), utilizando concentraciones en el rango 0,25-7  $\mu\text{g/ml}$ , siendo el límite de cuantificación más bajo igual a 0,6 nmol/ml inyectado.

Las actividades del sistema PON fueron significativamente mayores en el líquido folicular de folículos grandes en comparación con el de pequeños, tanto en Donantes como en Pacientes. Estos datos evidencian un posible papel de PON en el desarrollo folicular. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que se centra en la determinación de las actividades del sistema PON en relación con este aspecto de la reproducción humana. El crecimiento de ovocitos implica un aumento en el número de mitocondrias, donde la fosforilación oxidativa tiene lugar para producir la energía requerida para la maduración del ovocito desde la etapa de vesícula germinal (*Eichenlaub-Ritter y cols., 2011*). Las mitocondrias son los principales orgánulos responsables de la producción de ROS en las células, de forma que la concentración de ROS debe estar estrictamente controlada por los sistemas antioxidantes para conseguir un embrión de buena calidad. Cabe destacar que se han detectado en mitocondrias las proteínas PON2 y PON3 (*Schweikert y cols., 2012; Devarajan y cols., 2011*).

No sabemos realmente hasta qué punto las diferencias encontradas en las actividades del sistema PON entre folículos pequeños y grandes no se deben a un aumento de la vascularización durante la maduración folicular. En un estudio paralelo hemos caracterizado las actividades y la expresión de las proteínas extracelulares PON1 y PON3 en suero y líquido folicular. Para cada mujer que participó en el estudio se obtuvieron muestras de suero y líquido folicular después de un ciclo de estimulación ovárica. Los resultados no mostraron asociaciones de las concentraciones de los enzimas entre los dos fluidos. Las actividades de PON1 analizadas fueron significativamente mayores en el suero que en el líquido folicular. Sin embargo, la concentración de PON1 fue similar en ambos fluidos. En cuanto a la actividad simvastatinasa (PON3), no se encontraron diferencias entre el suero y el líquido folicular, pero su expresión fue significativamente mayor en el suero (datos no mostrados), lo que indica mecanismos complejos de regulación enzimática. Estos resultados sugieren que

las actividades que hemos determinado en este trabajo no reflejan simplemente una mayor tasa de infiltración de las HDL (principales transportadoras de las proteínas procedentes de la sangre), sino que indican que los mecanismos que regulan las actividades de los enzimas PON1 y PON3 en el líquido folicular son diferentes a los que operan en la sangre y sugieren un papel de PON3 en la reproducción.

Hemos visto también que la actividad PON3 fue marcadamente mayor en el líquido folicular de Donantes que en el de Pacientes. Estas diferencias no se debieron a diferencias en la edad entre ambos grupos poblacionales, como se pudo constatar utilizando diferentes modelos de regresión logística multivariable. En las donantes de óvulos encontramos una clara correlación positiva entre las actividades PON1 arilesterasa y paraoxonasa con el número de ovocitos totales y maduros. Se ha descrito en la bibliografía que determinados antioxidantes (como la melatonina) en el folículo en crecimiento pueden ser factores clave para evitar la atresia y, por tanto, permitir el crecimiento folicular y consiguientemente el desarrollo del ovocito (Cruz y cols., 2014).

Por otro lado, las funciones fisiológicas de las proteínas de la familia PON pueden incluir la desintoxicación de lactonas (lactonas exógenas o endógenas derivadas de lípidos oxidados) y de compuestos organofosforados, aunque se desconoce el sustrato fisiológico de PON. Se ha descrito que la hiperhomocisteinemia puede afectar al proceso reproductivo en varios niveles (Ocal y cols., 2012). Se cree que la principal causa de la toxicidad de la homocisteína (Hcy) son sus metabolitos. Específicamente la Hcy-tiolactona, cuya síntesis aumenta al aumentar la concentración de Hcys, es un metabolito reactivo que causa la N-homocisteinilación de proteínas, deteriorando así la función proteica (Jakubowski, 2010). En condiciones fisiológicas las proteínas de la familia PON degrada, entre otros compuestos, Hcy-tiolactona (She y cols., 2012). La actividad Hcy-tiolactonasa de PON determina los niveles plasmáticos de proteínas modificadas por N-Hcy, lo que indica que PON protege a las proteínas frente a la N-homocisteinilación *in vivo* (Perla-Kaján y Jakubowski, 2010). Queda por investigar el posible papel que juegan estas enzimas en la

protección del líquido folicular frente a la toxicidad desencadenada por Hcy y su implicación en los resultados en la reproducción asistida.

En el artículo de análisis proteómico citado anteriormente también se muestra la presencia de las isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\pi$  y  $\omega 1$  de GST (Oh y cols., 2017). En un trabajo previo se vio que en el líquido folicular de mujeres que se someten a ciclos de FIV la proteína GST $\alpha 1$  se encuentra a unas concentraciones mayores que en el plasma sanguíneo, lo que implica la síntesis local por las células ováricas (Bisseling y cols., 1997). La concentración de la proteína en el líquido folicular comparado con el plasma fue más pronunciada para GST $\alpha 1$  que para GST $\pi$ . Esta observación está de acuerdo con las concentraciones mayores de GST $\alpha$  en células de la granulosa y del cúmulo oóforo que las de GST $\pi$ . Las células de la granulosa, productoras de esteroides, contienen más GST $\alpha$  que las del cúmulo. GST $\alpha 1$  se asocia con la actividad  $\Delta 5$ -3-cetoesteroide isomerasa dependiente de GSH, que cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona (junto con la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa). Sin embargo, parece que la concentración del enzima no varía con las fluctuaciones hormonales durante un ciclo natural, lo que podría indicar un papel desintoxicador para proteger al ovocito de xenobióticos, mas que su participación mera participación en la esteroidogénesis.. Se han detectado bifenilos policlorados, hexaclorobenceno (fungicida) y pesticidas en el líquido folicular de mujeres sometidas a ciclos FIV (Jirsová y cols., 2010). Estos compuestos xenobióticos inducen la expresión de GST en otros tejidos diferentes del ovario. Nosotros hemos detectado actividad GST utilizando como sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno.

La actividad GST fue sorprendentemente menor al aumentar el tamaño folicular. Desconocemos la causa de esta diferencia. Diversos tóxicos ambientales provocan la pérdida de folículos primordiales y preantrales de forma dependiente de la dosis y pueden alterar el desarrollo folicular y provocar infertilidad (Mark-Kappeler y cols., 2011). El desarrollo folicular es complejo, con múltiples etapas y diferentes señales en cada etapa folicular. En muchas ocasiones los efectos observados por xenobióticos implican disminuciones en la reserva ovárica de folículos primordiales, que van a dar

lugar a los folículos antrales antes de la ovulación. Si el xenobiótico provoca efectos tóxicos solamente en los folículos maduros la toxicidad podría ser temporal y rápida; por el contrario, el daño y la pérdida de folículos primordiales es irreversible, causando infertilidad temprana. Podemos especular que GST tiene un papel relevante en la protección folicular en esta etapa temprana en la que aún no se ha desarrollado suficientemente el folículo.

Se ha descrito que en células de granulosa bovinas las hormonas gonadotrópicas regulan la expresión de GST $\alpha$  mRNA. Así, Rabahi y cols. (1999) observaron una reducción significativa de la expresión del mRNA de GST $\alpha$  en folículos preovulatorios a las 24 h de la inyección de hCG aunque esta reducción era menor si se pretrataban los folículos con FSH (Rabahi y cols., 1999). Si la diferencia en la actividad GST que hemos observamos fuese un mecanismo mediado por receptores de hormonas gonadotrópicas similar al observado en folículos bovinos, los folículos de menor tamaño, por tener menos receptores, podrían responder en menor grado a esta señal, por lo que la concentración del enzima y consiguientemente su actividad estarían más elevadas que en folículos grandes. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los distintos niveles de expresión de GST $\alpha$  pueden reflejar diferencias entre especies, y, además, el efecto de las gonadotropinas varía dependiendo del estado de maduración en el que se encuentra el folículo.

Con respecto a la capacidad antioxidante del líquido folicular, hemos visto que en Donantes aumentan significativamente TAC, ORAC y la actividad GPx dependiente de selenio al aumentar el tamaño folicular, permaneciendo constantes las actividades SOD, CAT y GPx total. Si bien se han descrito cambios en las actividades SOD (Combelles y cols., 2010), CAT (Gupta y cols., 2011) y GPx (Basini y cols., 2008) a lo largo del desarrollo folicular, hemos de tener en cuenta que estos estudios se han realizado en animales, habiendo hecho el seguimiento durante un ciclo natural. En nuestro caso, en cambio, se trata de un ciclo FIV con una fase de hiperestimulación ovárica, que da lugar a niveles suprafisiológicos de estradiol. Un análisis proteómico del líquido folicular muestra una expresión diferente atendiendo a si las muestras proceden de ciclos naturales o ciclos de hiperestimulación ovárica; entre estas proteínas con

distinta expresión se encuentran enzimas que participan en la eliminación de radicales libres (Wu y cols., 2015). Quizá esta estimulación artificial, y la elevada concentración de estradiol que conlleva, anulan los cambios de expresión de actividades antioxidantes asociados a una maduración folicular normal, lo que nos impide ver diferencias en función del tamaño folicular.

Respecto a la actividad antioxidante total del líquido folicular, tanto para determinar TAC como ORAC, hemos cuantificado el área bajo la curva (AUC), que combina el tiempo y el grado de inhibición ejercido por los antioxidantes presentes en el líquido folicular (Cao y cols., 1995; Re y cols., 1999). Supone una mejora respecto a otras determinaciones en las que se utiliza únicamente el porcentaje de inhibición a un tiempo final. AUC considera no sólo la concentración del antioxidante, sino también que la cinética de la eliminación de radicales cambia a lo largo del tiempo y es, por tanto, una medida total de la capacidad de los compuestos de eliminar radicales libres. Nuestros resultados respecto a la capacidad antioxidante total del líquido folicular irían en concordancia con los obtenidos para otros parámetros que hemos analizado del estado antioxidante del fluido y que apuntan a un aumento de las defensas antioxidantes con la foliculogénesis.

Se han descrito alteraciones de la TAC, actividad CAT y de los niveles de  $H_2O_2$  en líquido folicular bovino. En particular, la TAC aumenta y la actividad CAT y el  $H_2O_2$  disminuyen significativamente al aumentar el tamaño del folículo (Gupta y cols., 2011). Los autores proponen que una TAC baja y una concentración elevada de  $H_2O_2$  en los folículos pequeños indicaría que los niveles de ROS están elevados en las etapas iniciales de la foliculogénesis y que CAT podría representar una defensa antioxidante dominante en las fases tempranas del desarrollo folicular. Sin embargo, estos resultados son opuestos a lo que se ha descrito en el líquido folicular porcino, donde la actividad CAT es mayor en los folículos más grandes (Basini y cols., 2008), lo que puede deberse a que la expresión de CAT y su actividad son dependientes de la especie (El Mouatassim y cols., 1999). Nosotros no hemos obtenido diferencias de la actividad CAT en función del tamaño folicular; sin embargo, aumentan las actividades GPx dependiente de selenio y las de la familia de las

paraoxonasas, lo que sugiere que la defensa antioxidante en las etapas finales de la maduración folicular, al menos en humanos, correría a cargo de estas actividades y no de CAT

Además, la actividad Se-GPx se correlacionó positivamente con el número de ovocitos totales y maduros. Se ha descrito que la actividad GPx, aunque está asociada con una disminución de GSH, es más efectiva para el ovocito que la actividad catalasa (*El Mouatassim y cols., 1999*). La actividad GPx en los folículos que producen ovocitos que son fertilizados es mayor que en los que no consiguen fertilizarse, sugiriéndose un papel del enzima en el proceso de fertilización (*Paszkowski y cols., 1995*). No conocemos exactamente la isoforma de GPx en el LF responsable de la actividad que hemos determinado. Se ha descrito en la bibliografía que en la fase folicular aumenta la expresión de la selenoproteína GPx4 en el oviducto (*Lapointe y cols., 2005*). Recientemente, mediante aproximaciones proteómicas, se ha identificado GPx3 en el LF de mujeres sometidas a estimulación ovárica (*Oh y cols., 2017*).

Se han publicado trabajos en los que se ha comprobado que en las células de la granulosa de pacientes enroladas en terapia FIV los niveles de mRNA y de las proteínas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y CAT disminuyen con la edad, acumulándose mayores cantidades de ROS, y siendo una posible causa de infertilidad (*Tatone y cols., 2006*). En el grupo de Pacientes de nuestro estudio encontramos una correlación positiva muy significativa entre la actividad CAR y la tasa de fertilización, lo que sugiere la participación de dicha actividad en la fecundación.

El líquido folicular está enriquecido en proteínas, que son la principal diana del ataque radicalario. El daño oxidativo de las proteínas puede provocar la escisión del esqueleto polipeptídico y modificaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos que las constituyen. Existen varios tipos de modificaciones oxidativas proteínicas inducidas directamente por ROS y mediadas por metales de transición o indirectamente por reacciones con productos secundarios de estrés oxidativo. Las proteínas oxidadas que no son reparadas normalmente se degradan y son reemplazadas por nuevas proteínas. La determinación de

proteínas oxidadas *in vivo* es, por tanto, una estimación de los niveles estacionarios que dependen de la velocidad de formación, de la velocidad de reparación y recambio y del aclaramiento de las proteínas diana de los ataques radicalarios. En esta tesis doctoral describimos un método para detectar y cuantificar biomarcadores de lesión oxidativa no enzimática de proteínas del líquido folicular humano mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Por primera vez se han detectado y cuantificado con precisión en dicho fluido biológico las concentraciones basales de 4 biomarcadores: 1) semialdehído glutámico (GSA), 2) semialdehído aminoacético (AASA), ambos como marcadores de lesión oxidativa directa, 3) carboxietil-lisina (CEL), como marcador de modificación secundaria a la lesión oxidativa de carbohidratos (glicoxidación), y 4) carboximetil-lisina (CML), como marcador mixto de glicoxidación y de modificación secundaria a lesión oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados (lipoperoxidación).

Hemos visto que en estado estacionario la lesión oxidativa de proteínas debida directamente a ROS es mayor que la procedente de la oxidación secundaria a productos de glicoxidación y lipoperoxidación (15%). Además, las proteínas del líquido folicular contenían una cantidad mucho mayor de GSA (producto que deriva principalmente de las modificaciones oxidativas en Arg y Pro) que de AASA (derivado de las modificaciones oxidativas en Lys). El grado de oxidación proteínica reflejado por estos marcadores dependerá de su composición en estos aminoácidos y de la accesibilidad de los mismos al agente prooxidante.

En este trabajo hemos visto diferencias significativas en el tipo y grado de lesión de las proteínas dependiendo del grupo poblacional. Así, las Pacientes presentan un aumento de los marcadores de oxidación como consecuencia de la glicoxidación (CEL), siendo similar en ambos grupos el daño proteínico derivado de procesos lipoperoxidativos. Respecto a lesiones proteínicas debidas a la exposición directa a ROS mediada por metales de transición, en Donantes hay un aumento de los marcadores de oxidación en residuos de prolina y arginina (GSA), mientras que en Pacientes aumentan las



modificaciones oxidativas en residuos de lisina (AASA). Por otro lado, las pacientes que concluyen un ciclo productivo (consiguen embarazo) presentan menores niveles de lesión oxidativa en los aminoácidos prolina y arginina, y mayor modificación oxidativa de lisinas.

Las modificaciones oxidativas de las proteínas pueden causar cambios estructurales y funcionales, y afectar a las actividades enzimáticas, así como interferir en las vías de señalización (*Uchida y Stadtman, 1992; Monroy y cols., 2013*).

Desconocemos el significado de las diferencias existentes en el perfil de lesión proteica en nuestro estudio y si las proteínas dañadas asociadas a estos marcadores realmente desempeñan funciones específicas en el proceso reproductor. La modificación del proteoma folicular por compuestos reactivos induce un estrés oxidativo y quizás disfunción. Así, estas modificaciones oxidativas de las proteínas podrían jugar un papel en la fisiología de la reproducción y en patologías asociadas a la infertilidad. Sin embargo, existen dudas por resolver, como saber si existen proteínas que sean dianas preferentes de estas modificaciones no enzimáticas y si el grado de lesión proteínica es suficiente para explicar las disfunciones. En este contexto la determinación de los niveles de un marcador dado en estado estacionario no nos permite discernir si se están dañando proteínas específicas, determinantes para el proceso reproductivo. La identificación de las proteínas específicas modificadas y el conocimiento de los cambios funcionales asociados y las consiguientes implicaciones fisiopatológicas en la reproducción suponen en sí un tema de investigación por desarrollar con implicaciones directas en las técnicas y en los resultados de la reproducción asistida.









## *CONCLUSIONES*











## 6. CONCLUSIONES

1. Existen diferencias significativas del estado antioxidante del líquido folicular entre folículos en desarrollo y maduros, que se manifiestan principalmente en que al aumentar el tamaño folicular aumentan la actividad antioxidante total (TAC), la capacidad absorbente de radicales del oxígeno (ORAC), el óxido nítrico, las actividades de los enzimas antioxidantes de la familia PON (arilesterasa, paraoxonasa, metilparaoxonasa y simvastatinasa) y la actividad glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Se-GPx). Estas diferencias se dan en la población sana (Donantes) y en menor medida en Pacientes. Los datos indican la importancia de mantener un estado reducido del líquido folicular para la correcta maduración del folículo.

2. Diversos marcadores del estado antioxidante del líquido folicular se asocian a parámetros de fertilidad tras un ciclo de estimulación ovárica controlada. En particular, las actividades Se-GPx, arilesterasa, paraoxonasa y metilparaoxonasa se correlacionan positivamente con el número de ovocitos totales y maduros en Donantes, y la actividad CAT con la tasa de fertilización en Pacientes.

3. El enzima GST presenta un perfil de actividad distinto al del resto de enzimas. Así, la actividad GST disminuye al aumentar el tamaño del folículo. Estos datos sugieren que este enzima podría tener un papel relevante en las primeras etapas del desarrollo folicular, actuando como eliminador de xenobióticos (función desintoxicadora).

4. Existen diferencias significativas entre Donantes y Pacientes de los niveles foliculares de alfa-tocoferol (aumenta en Pacientes), de la TAC y de la actividad PON3 simvastatinasa (ambas disminuyen en Pacientes). Sin embargo, a pesar de su menor actividad, la proteína PON3 intrafolicular es más abundante en Pacientes que en Donantes. Estos resultados sugieren un papel novedoso de PON3 en la fertilidad, y animan a profundizar en el conocimiento de esta familia de enzimas y su papel en la reproducción humana.

5. No existen diferencias de los marcadores antioxidantes del líquido folicular nombrados anteriormente entre ciclos productivos y no productivos, al menos para el tamaño muestral que se ha utilizado en este estudio.

6. Se ha puesto a punto un método para la detección y cuantificación de marcadores de diferente tipo de lesión oxidativa de proteínas del líquido folicular humano, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Por primera vez se ha determinado en dicho fluido biológico la concentración basal de GSA y AASA, como marcadores de lesión oxidativa directa, CEL, como marcador de lesión oxidativa de por glicoxidación, y CML, como marcador mixto de lesión oxidativa por glicoxidación y por lipoperoxidación.

7. La lesión oxidativa proteínica basal más abundante se debe a la exposición directa a ROS mediada por metales de transición y en menor medida a procesos derivados de la glicoxidación y lipoperoxidación.

8. Existen diferencias en el tipo de lesión oxidativa de proteínas del líquido folicular entre Donantes y Pacientes, presentando las Pacientes un mayor daño proteínico derivado de procesos de glicoxidación (CEL). Respecto a la oxidación directa por ROS, las proteínas del líquido folicular de Pacientes sufren mayores modificaciones oxidativas en residuos de lisina y menores lesiones en residuos de prolina y arginina que las Donantes.

9. Existen diferencias en el grado de lesión oxidativa directa de proteínas del líquido folicular entre ciclo productivo y no productivo. Así, los ciclos productivos se asocian a una menor lesión oxidativa en residuos de prolina y arginina, y a una mayor modificación oxidativa en residuos de lisina. Los datos sugieren que el daño oxidativo de lisinas proteicas, reflejado en un aumento de los niveles del biomarcador AASA, no es crítico para la consecución de embarazo.









# *BIBLIOGRAFÍA*











## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acién P. Reproductive performance of women with uterine malformations. *Human Reproduction* 1993 January 01;8(1):122-6.
- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993 Mar;52(3):598-608.
- Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008 Aug;10(8):1375-403.
- Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive BioMedicine Online* 2004;9(3):338-47.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 Oct;42(10):1634-50.
- Al-Gubory KH, Bolifraud P, Germain G, Nicole A, Ceballos-Bicot I. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reproduction* 2004 December 01;128(6):767-74.
- Ambekar AS, Nirujogi RS, Srikanth SM, Chavan S, Kelkar DS, Hinduja I, Zaveri K, Prasad TSK, Harsha HC, Pandey A, et al. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. *Journal of Proteomics* 2013 7/11;87:68-77.
- Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1993 11/01;77(5):1227-34.
- Angelucci ,Stefania, Ciavardelli ,Domenico, Di Giuseppe ,Fabrizio, Eleuterio ,Enrica, Sulpizio ,Marilisa, Tiboni G,Mario, Giampietro ,Franca, Palumbo ,Paola, Di Ilio ,Carmine. Proteome analysis of human follicular fluid. .
- Angelucci S, Ciavardelli D, Di Giuseppe F, Eleuterio E, Sulpizio M, Tiboni GM, Giampietro F, Palumbo P, Di Ilio C. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764.

- Anteby EY, Hurwitz A, Korach O, Revel A, Simon A, Finci-yeheskel Z, Mayer M, Laufer N. Ovary and ovulation: Human follicular nitric oxide pathway: Relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. *Human Reproduction* 1996 September 01;11(9):1947-51.
- Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome NP, Muttukrishna S. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil Steril* 2008 Apr;89(4):912-21.
- Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, Barreca A, Droghini F, Volpe A, Genazzani AR. Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum Reprod* 1994 May;9(5):902-6.
- Asimakopoulos B, Abu-Hassan D, Metzen E, Al-Hasani S, Diedrich K, Nikolettos N. The levels of steroid hormones and cytokines in individual follicles are not associated with the fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008 Jul;90(1):60-4.
- Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 2002 May 1;32(9):841-59.
- Aurrekoetxea I, Ruiz-Sanz JI, del Agua AR, 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 9;94(4):1279-86.
- Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* 2004 Jun;23(3):423-33.
- Bachvarova R. Gene expression during oogenesis and oocyte development in mammals. *Dev Biol (N Y)* 1985;1:453-524.
- Badawy A, Nashar BE, El Totongy M. Clomiphene citrate plus *N*-acetyl cysteine versus clomiphene citrate for augmenting ovulation in the management of unexplained infertility: A randomized double-blind controlled trial. *Fertil Steril* 2016/07;86(3):647-50.
- Bar-Rogovsky H, Hugenmatter A, Tawfik DS. The evolutionary origins of detoxifying enzymes: THE MAMMALIAN SERUM PARAOXONASES (PONs) RELATE TO BACTERIAL HOMOSERINE LACTONASES. *Journal of Biological Chemistry* 2013 August 16;288(33):23914-27.

- Basini G, Grasselli F, Bianco F, Tirelli M, Tamanini C. Effect of reduced oxygen tension on reactive oxygen species production and activity of antioxidant enzymes in swine granulosa cells. *Biofactors* 2004;20(2):61-9.
- Basini G, Grasselli F. Nitric oxide in follicle development and oocyte competence. *Reproduction* 2015 July 01;150(1):R1-9.
- Basini G, Simona B, Santini SE, Grasselli F. Reactive oxygen species and antioxidant defences in swine follicular fluids. *Reprod Fertil Dev* 2008;20(2):269-74.
- Basuino L, Silveira CF, Jr. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist Reprod* 2016 Mar 1;20(1):38-40.
- Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000 Jun 15;28(12):1708-16.
- Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001 Jan-Feb;8(1 Suppl Proceedings):S40-2.
27. Bergh C, Broden H, Lundin K, Hamberger L. Comparison of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocytes from large and small follicles. *Hum Reprod* 1998 Jul;13(7):1912-5.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997 Aug 15;272(33):20313-6.
- Bisseling JGA, Knapen MFCM, Goverde HJM, Mulder TPJ, Peters WHM, Willemsen WNP, Thomas CMG, A.P. Steegers E. Glutathione S-transferases in human ovarian follicular fluid. *Fertility and Sterility* 1997 November 1997;68(5):907-11.
- Bloom MS, Kim K, Fujimoto VY, Browne RW. Variability in the components of high-density lipoprotein particles measured in human ovarian follicular fluid: A cross-sectional analysis. *Fertil Steril* 2014 May;101(5):1431-40.
- Botella-Llusiá J. Capítulo 1: El ovario en los vertebrados capítulo 2: Desarrollo del ovario. In: **El ovario: fisiología y patología**. Madrid: Díaz de Santos; 2007. .
- Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001 Jun;68(6):1428-36.
- Brown GC. Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci* 2007 Jan 1;12:1024-33.
- Browne RW, Bloom MS, Shelly WB, Ocque AJ, Huddleston HG, Fujimoto VY. Follicular fluid high density lipoprotein-associated micronutrient levels are

- associated with embryo fragmentation during IVF. *J Assist Reprod Genet* 2009 Nov-Dec;26(11-12):557-60.
- Browne RW, Shelly WB, Bloom MS, Ocque AJ, Sandler JR, Huddleston HG, Fujimoto VY. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. *Human Reproduction* 2008 August 01;23(8):1884-94.
- Browne RW, Shelly WB, Bloom MS, Ocque AJ, Sandler JR, Huddleston HG, Fujimoto VY. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. *Hum Reprod* 2008 Aug;23(8):1884-94.
- Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Sep 27;91(20):9441-5.
- Cao G, Verdon CP, Wu AH, Wang H, Prior RL. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clin Chem* 1995 Dec;41(12 Pt 1):1738-44.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1993 March 1993;14(3):303-11.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 1993 March 1993;14(3):303-11.
- Carson SD, Bowman BH. Low molecular weight plasma proteins isolated from preparations of human immunoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1981 Jan 30;667(1):23-34.
- Cataldi T, Cordeiro FB, da Costa, Livia Do, Vale Teixeira, Pilau EJ, Ferreira CR, Gozzo F, Eberlin MN, Bertolla RP, Cedenho AP, Lo Turco EG. Lipid profiling of follicular fluid from women undergoing IVF: Young poor ovarian responders versus normal responders. *Human Fertility* 2013 12/01;16(4):269-77.
- Cerit N, Onuk AA, Ellidag HY, Eren E, Bulbuller N, Yilmaz N. Arylesterase and oxidative stress in operating room personnel. *Adv Clin Exp Med* 2014 Jan-Feb;23(1):49-55.
- Céspedes Miranda EM, Hernández Lantigua I, Llópiz Janer N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. catalasa. *Revista Cubana De Investigaciones Biomédicas* 1996;15(2):0-

- Chan AC. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharmacol* 1993 Sep;71(9):725-31.
- Choi DH, Lee WS, Won M, Park M, Park HO, Kim E, Lee KA, Bae J. The apolipoprotein A-I level is downregulated in the granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome and affects steroidogenesis. *J Proteome Res* 2010 Sep 3;9(9):4329-36.
- Chow K, Cheung M, Cheung IK. Psychosocial interventions for infertile couples: A critical review. *J Clin Nurs* 2016;25(15-16):2101-13.
- Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993 Feb 5;268(4):2571-6.
- Cohen G, Kim M, Ogwu V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods* 1996 Jul;67(1):53-6.
- Combelles CM, Holick EA, Paoletta LJ, Walker DC, Wu Q. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. *Reproduction* 2010 May;139(5):871-81.
- Cordeiro FB, Cataldi TR, do Vale Teixeira dC, de Lima CB, Stevanato J, Zylbersztejn DS, Ferreira CR, Eberlin MN, Cedenho AP, Turco EGL. Follicular fluid lipid fingerprinting from women with PCOS and hyper response during IVF treatment. *J Assist Reprod Genet* 2014 10/20;32(1):45-54.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003;54:371-92.
- Cruz MHC, Leal CLV, Cruz JF, Tan DX, Reiter RJ. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 2014 10/15;82(7):925-32.
- Dale B, Menezo Y, Cohen J, DiMatteo L, Wilding M. Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod* 1998 Apr;13(4):964-70.
- D'Aniello G, Grieco N, Di Filippo MA, Cappiello F, Topo E, D'Aniello E, Ronsini S. Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 2007 Dec;22(12):3178-83.
- de los Santos MJ, Garcia-Laez V, Beltran D, Labarta E, Zuzuarregui JL, Alama P, Gamiz P, Crespo J, Bosch E, Pellicer A. The follicular hormonal profile in low-



responder patients undergoing unstimulated cycles: Is it hypoandrogenic? *Hum Reprod* 2013 Jan;28(1):224-9.

De Placido G, Alviggi C, Perino A, Strina I, Lisi F, Fasolino A, De Palo R, Ranieri A, Colacurci N, Mollo A, et al. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multicentre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005 Feb;20(2):390-6.

Dea MK, Hamilton-Wessler M, Ader M, Moore D, Schaffer L, Loftager M, Volund A, Bergman RN. Albumin binding of acylated insulin (NN304) does not deter action to stimulate glucose uptake. *Diabetes* 2002 Mar;51(3):762-9.

Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, Clarke CF, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, et al. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2011 Feb 1;14(3):341-51.

Draganov DI. Human PON3, effects beyond the HDL: Clues from human PON3 transgenic mice. *Circ Res* 2007 Apr 27;100(8):1104-5.

Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol Cell Endocrinol* 2006 5/16;250(1-2):70-9.

Dubey AK, An Wang H, Duffy P, Penzias AS. The correlation between follicular measurements, oocyte morphology, and fertilization rates in an in vitro fertilization program\*. *Fertility and Sterility* 1995 October 1995;64(4):787-90.

Dun EC, Nezhat CH. Tubal factor infertility: Diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2012 12;39(4):551-66.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001 April 01;21(4):473-80.

Eaton S. The biochemical basis of antioxidant therapy in critical illness. *Proc Nutr Soc* 2006 Aug;65(3):242-9.

Ectors FJ, Vanderzwalmen P, Van Hoeck J, Nijs M, Verhaegen G, Delvigne A, Schoysman R, Leroy F. Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997 Sep;12(9):2002-5.

Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Luke S, Seidel T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in

- mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 2011 Sep;11(5):783-96.
- El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 1999 Aug;5(8):720-5.
- El Mouatassim S, Guérin P, Ménézo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Molecular Human Reproduction* 1999 August 01;5(8):720-5.
- Enien WM, Chantler E, Seif MW, Elstein M. Human ovarian granulosa cells and follicular fluid indices: The relationship to oocyte maturity and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1998 May;13(5):1303-6.
- Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: A comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006 Feb 23;5:4.
- Estes SJ, Ye B, Qiu W, Cramer D, Hornstein MD, Missmer SA. A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women  $\leq 32$  years old. *Fertil Steril* 2009 11;92(5):1569-78.
- Fahiminiya S, Reynaud K, Labas V, Batard S, Chastant-Maillard S, Gerard N. Steroid hormones content and proteomic analysis of canine follicular fluid during the preovulatory period. *Reprod Biol Endocrinol* 2010 Nov 1;8:132,7827-8-132.
- Farrah T, Deutsch EW, Omenn GS, Campbell DS, Sun Z, Bletz JA, Mallick P, Katz JE, Malmstrom J, Ossola R, et al. A high-confidence human plasma proteome reference set with estimated concentrations in PeptideAtlas. *Mol Cell Proteomics* 2011 Sep;10(9):M110.006353.
- Fayezi S, Darabi M, Darabi M, Nouri M, Rahimipour A, Mehdizadeh A. Analysis of follicular fluid total phospholipids in women undergoing in-vitro fertilisation. *J Obstet Gynaecol* 2014 Apr;34(3):259-62.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994 Feb;50(2):225-32.
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1986;58:61-97.
- Fried G, Remaeus K, Harlin J, Krog E, Csemiczky G, Aanesen A, Tally M. Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-1/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2003 May;20(5):167-76.

- Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions. *J Biol Chem* 1996 Apr 26;271(17):9982-6.
- Fujimoto VY, Kane JP, Ishida BY, Bloom MS, Browne RW. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. *Hum Reprod Update* 2010 Jan-Feb;16(1):20-38.
- Fujimoto VY, Kane JP, Ishida BY, Bloom MS, Browne RW. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. *Hum Reprod Update* 2010 Jan-Feb;16(1):20-38.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011 Sep 15;15(6):1583-606.
- Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem* 1989 8/1;180(2):242-7.
- Ghyselinck NB, Dufaure JP. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic Acids Res* 1990 Dec 11;18(23):7144.
- Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 Jan;91(1):336-40.
- Gonzalez-Fernandez R, Gaytan F, Martinez-Galisteo E, Porras P, Padilla CA, Sanchez Criado JE, Barcena JA. Expression of glutaredoxin (thioltransferase) in the rat ovary during the oestrous cycle and postnatal development. *J Mol Endocrinol* 2005 Jun;34(3):625-35.
- GONZALEZ-MERLO J, GONZALEZ BOSQUET J, GONZALEZ BOSQUET E. Capitulo 3: Ciclo ovárico (ovulación). ciclo endometrial (menstruación). In: **Ginecología**. 8ª ed. Barcelona: Manson; 2003. .
- Gonzalez-Parraga P, Hernandez JA, Arguelles JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the acquisition of oxidative tolerance in candida albicans. *Yeast* 2003 Oct 30;20(14):1161-9.
- Goossens V, De Vos K, Vercammen D, Steemans M, Vancompernelle K, Fiers W, Vandenaabeele P, Grooten J. Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors* 1999;10(2-3):145-56.

- Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Abu-Soud HM. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry* 2005 Aug 30;44(34):11361-8.
- Goud C, DiPiero A, Lockette WE, Webb RC, Charpie JR. Cyclic GMP-independent mechanisms of nitric oxide-induced vasodilation. *General Pharmacology: The Vascular System* 1999 1;32(1):51-5.
- Gougeon A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Ann Endocrinol* 2010 5;71(3):132-43.
- Griess JP. Bemerkungen zu der abhandlung der HH. wesely und benedikt "Übereinige azoverbindungen" . *Ber Deutsch Chem Ges* 1879;12:426-8.
- Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001 Mar-Apr;7(2):175-89.
- Gupta S, Choi A, Yu HY, Czerniak SM, Holick EA, Paoletta LJ, Agarwal A, Combelles CMH. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity, and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. *Reprod Fertil Dev* 2011;23(5):673-80.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974 Nov 25;249(22):7130-9.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. *Journal of Biological Chemistry* 1974 November 25;249(22):7130-9.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990 July 1990;280(1):1-8.
- Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004 Oct 1;13(19):2263-78.
- Hansen JC, Deguchi Y. Selenium and fertility in animals and man--a review. *Acta Vet Scand* 1996;37(1):19-30.
- Hashemi M, Kordi-Tamandani DM, Sharifi N, Moazeni-Roodi A, Kaykhaei MA, Narouie B, Torkmanzehi A. Serum paraoxonase and arylesterase activities in metabolic syndrome in zahedan, southeast iran. *Eur J Endocrinol* 2011 Feb;164(2):219-22.
- Hashemitabar M, Bahmanzadeh M, Mostafaie A, Orazizadeh M, Farimani M, Nikbakht R. A proteomic analysis of human follicular fluid: Comparison

- between younger and older women with normal FSH levels. *Int J Mol Sci* 2014 Sep 29;15(10):17518-40.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
- Hennet ML, Combelles CM. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol* 2012;56(10-12):819-31.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 1997 Jun 27;272(26):16644-51.
- Hsieh M, Zamah AM, Conti M. Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: Role in oocyte development and maturation. *Semin Reprod Med* 2009 Jan;27(1):52-61.
- Hubalek M, Buchner H, Mörtl MG, Schlembach D, Huppertz B, Firulovic B, Köhler W, Hafner E, Dieplinger B, Wildt L, et al. The vitamin E-binding protein afamin increases in maternal serum during pregnancy. *Clinica Chimica Acta* 2014 7/1;434:41-7.
- Irving-Rodgers HF, Hummitchsch K, Murdiyarsolo LS, Bonner WM, Sado Y, Ninomiya Y, Couchman JR, Sorokin LM, Rodgers RJ. Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. *Cell Tissue Res* 2010 Mar;339(3):613-24.
- Jakubowski H. The role of paraoxonase 1 in the detoxification of homocysteine thiolactone. *Adv Exp Med Biol* 2010;660:113-27.
- Jarkovska K, Martinkova J, Liskova L, Halada P, Moos J, Rezabek K, Gadher SJ, Kovarova H. Proteome mining of human follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological pathways in women undergoing in vitro fertilization. *J Proteome Res* 2010 Mar 5;9(3):1289-301.
- Jaspard B, Fournier N, Vieitez G, Atger V, Barbaras R, Vieu C, Manent J, Chap H, Perret B, Collet X. Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. A model for extravascular fluid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Aug;17(8):1605-13.
- Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review. *Placenta* 2003 Apr;24 Suppl A:S86-93.
- Jeremy JY, Okonofua FE, Thomas M, Wojdyla J, Smith W, Craft IL, Dandona P. Oocyte maturity and human follicular fluid prostanoids, gonadotropins, and

- prolactin after administration of clomiphene and pergonal. *J Clin Endocrinol Metab* 1987 Sep;65(3):402-6.
- Jerkovic L, Voegele AF, Chwatal S, Kronenberg F, Radcliffe CM, Wormald MR, Lobentanz EM, Ezeh B, Eller P, Dejori N, et al. Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression. *J Proteome Res* 2005 May-Jun;4(3):889-99.
- Jirsová S, Mašata J, Jech L, Zvárová J. Effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 1,1,1-trichloro-2,2,-bis (4-chlorophenyl)-ethane (DDT) in follicular fluid on the results of in vitro fertilization–embryo transfer (IVF-ET) programs. *Fertil Steril* 2010 4;93(6):1831-6.
- Jones LA, Anthony J, Henriquez FL, Lyons RE, Nickdel MB, Carter KC, Alexander J, Roberts CW. Toll-like receptor-4-mediated macrophage activation is differentially regulated by progesterone via the glucocorticoid and progesterone receptors. *Immunology* 2008 01/28;125(1):59-69.
- Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999 May;5(5):409-13.
- Jungheim ES, Macones GA, Odem RR, Patterson BW, Lanzendorf SE, Ratts VS, Moley KH. Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2011 May;95(6):1970-4.
- Kato H, Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Nakamura Y. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. *Reviews of Reproduction* 1997 May 01;2(2):81-3.
- Keay SD, Harlow CR, Wood PJ, Jenkins JM, Cahill DJ. Higher cortisol:Cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. *Hum Reprod* 2002 Sep;17(9):2410-4.
- Keefe DL, Marquard K, Liu L. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006 Jun;18(3):280-5.
- Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* 1991 Feb;40(2):190-6.
- Kuehl FA, Jr, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* 1980 Nov 28;210(4473):978-84.

- Kuhn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family: Many sequence data but little information on biological significance<sup>1</sup>. *FEBS Lett* 1999 4/16;449(1):7-11.
- Laloraya M, Pradeep KG, Laloraya MM. Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *rattus norvegicus* and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Nov 30;157(1):146-53.
- Lapointe J, Kimmins S, Maclaren LA, Bilodeau JF. Estrogen selectively up-regulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the oviducts. *Endocrinology* 2005 Jun;146(6):2583-92.
- Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Néel D, Lagrost L. Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is  $\alpha$ -tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Molecular Nutrition & Food Research* 2010;54(5):631-40.
- Lewicka S, von Hagens C, Hettlinger U, Grunwald K, Vecsei P, Runnebaum B, Rabe T. Cortisol and cortisone in human follicular fluid and serum and the outcome of IVF treatment. *Hum Reprod* 2003 Aug;18(8):1613-7.
- Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci* 2012 Aug;55(8):659-69.
- Lisi F, Rinaldi L, Fishel S, Lisi R, Pepe GP, Picconeri MG, Campbell A. Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients. *Reprod Biomed Online* 2002 Sep-Oct;5(2):104-8.
- Liu L, Keefe DL. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000 Jun;62(6):1828-34.
- Lobb DK, Dorrington JH. Human granulosa and thecal cells secrete distinct protein profiles. *Fertil Steril* 2016/11;48(2):243-8.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997 Sep;122(2):265-8.
- Maddipati KR, Marnett LJ. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. purification and properties of a selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1987 Dec 25;262(36):17398-403.
- Maeda A, Crabb JW, Palczewski K. Microsomal glutathione S-transferase 1 in the retinal pigment epithelium: Protection against oxidative stress and a potential role in aging. *Biochemistry* 2005 Jan 18;44(2):480-9.

- Markham S. Cervico-utero-tubal factors in infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1991 Apr;3(2):191-6.
- Mark-Kappeler CJ, Hoyer PB, Devine PJ. Xenobiotic effects on ovarian preantral follicles. *Biol Reprod* 2011 Nov;85(5):871-83.
- Marsillach J, Aragonés G, Mackness B, Mackness M, Rull A, Beltrán-Debón R, Pedro-Botet J, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids in Health and Disease* 2010 05/14;9:46-.
- Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: Relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Nov;79(5):1355-60.
- Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, et al. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol Reprod* 2000 Jul;63(1):141-6.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969 Nov 25;244(22):6049-55.
- McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 2006 Sep-Oct;8(9-10):1775-89.
- Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2008 Mar;100(3):234-8.
- Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martínez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002 Apr;17(4):1017-22.
- Miller C, Rivier J. Peptide chemistry: Development of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Peptide Science* 1996;40(3):265-317.
- Miller NJ, Johnston JD, Collis CS, Rice-Evans C. Serum total antioxidant activity after myocardial infarction. *Ann Clin Biochem* 1997 01/01; 2017/04;34(1):85-90.
- MILLS GC. Hemoglobin catabolism. I. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957 Nov;229(1):189-97.



- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson Jr. JE. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980;15(6):575-91.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001 2;5(1):62-71.
- Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, Katsuragi M, Odo S, Utsumi K, Inoue M. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 2010 8/15;49(4):674-81.
- Monroy CA, Doorn JA, Roman DL. Modification and functional inhibition of regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) by 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* 2013 11/14;26(12):1832-9.
- Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2008 May;25(5):183-6.
- Morgenstern R, Meijer J, Depierre JW, Ernster L. Characterization of rat-liver microsomal glutathione S-transferase activity. *Eur J Biochem* 1980 Feb;104(1):167-74.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004 Oct;122(4):369-82.
- Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 2006 Oct 1;41(7):1031-40.
- Ng A, Barker N. Ovary and fimbrial stem cells: Biology, niche and cancer origins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015 Oct;16(10):625-38.
- Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005 Jan 15;38(2):153-63.
- Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F. Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *The American Journal of Pathology* 2009 7;175(1):225-34.
- Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, Benian A. Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: Are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004 Aug 10;115(2):194-9.

- Ocal P, Ersoylu B, Cepni I, Guralp O, Atakul N, Irez T, Idil M. The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet* 2012 Apr;29(4):299-304.
- Oh JW, Kim SK, Cho K, Kim M, Suh CS, Lee JR, Kim KP. Back cover: Proteomic analysis of human follicular fluid in poor ovarian responders during in vitro fertilization. *Proteomics* 2017;17(6):1770046,n/a.
- Otsuki J, Nagai Y, Matsuyama Y, Terada T, Era S. The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2012 06/01;58(3):149-53.
- Pacella L, Zander-Fox DL, Armstrong DT, Lane M. Women with reduced ovarian reserve or advanced maternal age have an altered follicular environment. *Fertil Steril* 2012 10;98(4):986,994.e2.
- Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Galova Z, Badia R, Martínez P. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clinical & Experimental Immunology* 2006;144(2):217-22.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003 Jul 1;333(1):19-39.
- Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995 May 15;236(2):173-80.
- Perla-Kaján J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. *The FASEB Journal* 2010 March 01;24(3):931-6.
- Perrett D. Capillary electrophoresis in clinical chemistry. *Ann Clin Biochem* 1999 03/01; 2017/04;36(2):133-50.
- Perry AC, Jones R, Niang LS, Jackson RM, Hall L. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem J* 1992 Aug 1;285 ( Pt 3)(Pt 3):863-70.
- Petro EM, Leroy JL, Covaci A, Fransen E, De Neubourg D, Dirtu AC, De Pauw I, Bols PE. Endocrine-disrupting chemicals in human follicular fluid impair in vitro oocyte developmental competence. *Hum Reprod* 2012 Apr;27(4):1025-33.
- Pokorny J, Davidek J, Tran HC, Valentova H, Matejicek J, Dlaskova Z. Reactions of oxidized lipids with protein. part 15. mechanism of lipoprotein formation

- from interactions of oxidized ethyl linoleate with egg albumin. *Nahrung* 1988;32(4):343-50.
- Polak G, Koziół-Montewka M, Gogacz M, Błaszczowska I, Kotarski J. Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2001 2;94(2):261-3.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996 May 1;33(3):498-507.
- Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: An update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res* 2008 Feb;151(2):68-78.
- Rabahi F, Brule S, Sirois J, Beckers JF, Silversides DW, Lussier JG. High expression of bovine alpha glutathione S-transferase (GSTA1, GSTA2) subunits is mainly associated with steroidogenically active cells and regulated by gonadotropins in bovine ovarian follicles. *Endocrinology* 1999 Aug;140(8):3507-17.
- Radi R, Bush KM, Cosgrove TP, Freeman BA. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 1991 Apr;286(1):117-25.
- Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandeberg JL, Almasy L, Blangero J, Maccluer JW, Mahaney MC. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity (Edinb)* 2009 Feb;102(2):147-54.
- Rajkovic MG, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochem Med (Zagreb)* 2011;21(2):122-30.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999 5;26(9-10):1231-7.
- Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jan 2;98(1):69-74.
- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: From single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol* 2009 May 4;7:40,7827-7-40.
- Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994 Dec;15(6):725-51.

- Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009 2/15;235(1):1-9.
- Rochebrochard EdL, Thonneau P. Paternal age  $\geq 40$  years: An important risk factor for infertility. *Obstet Gynecol* 2003 10;189(4):901-5.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 2010 Jun;82(6):1021-9.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 2010 Jun;82(6):1021-9.
- Ruiz-Sanz JI, Aurrekoetxea I, Matorras R, Ruiz-Larrea MB. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2011 4;95(5):1601-5.
- Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Prevention of protein glycation by natural compounds. *Molecules* 2015 Feb 16;20(2):3309-34.
- Safronova VG, Matveeva NK, Avkhacheva NV, Sidel'nikova VM, Van'ko LV, Sukhikh GT. Changes in regulation of oxidase activity of peripheral blood granulocytes in women with habitual abortions. *Bull Exp Biol Med* 2003 Sep;136(3):257-60.
- Sahin E, DePinho RA. Axis of ageing: Telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 May 16;13(6):397-404.
- Sato EF, Kobuchi H, Edashige K, Takahashi M, Yoshioka T, Utsumi K, Inoue M. Dynamic aspects of ovarian superoxide dismutase isozymes during the ovulatory process in the rat. *FEBS Letters* 1992 1 June 1992;303(2):121-5.
- Schneider A, Absalon-Medina V, Esposito G, Corrêa M, Butler W. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 2013;48(6):989-94.
- Schüep W, Rettenmaier R. [25] analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: High-performance liquid chromatography. *Meth Enzymol* 1994;234:294-302.
- Schulpis KH, Barzeliotou A, Papadakis M, Rodolakis A, Antsaklis A, Papassotiriou I, Vlachos GD. Maternal chronic hepatitis B virus is implicated with low neonatal paraoxonase/arylesterase activities. *Clin Biochem* 2008 Mar;41(4-5):282-7.
- Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 2000 Feb;10(2):141-9.

- Schweikert EM, Devarajan A, Witte I, Wilgenbus P, Amort J, Forstermann U, Shabazian A, Grijalva V, Shih DM, Farias-Eisner R, et al. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ* 2012 Sep;19(9):1549-60.
- Seifer DB, DeJesus V, Hubbard K. Mitochondrial deletions in luteinized granulosa cells as a function of age in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002 11;78(5):1046-8.
- Shalgi R, Kraicer P, Rimon A, Pinto M, Soferman N. Proteins of human follicular fluid: The blood-follicle barrier. *Fertil Steril* 1973 Jun;24(6):429-34.
- She ZG, Chen HZ, Yan Y, Li H, Liu DP. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012 Mar 15;16(6):597-632.
- Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Jan 25;108(4):1462-7.
- Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82(2):291-5.
- Simsek M, Naziroglu M, Simsek H, Cay M, Aksakal M, Kumru S. Blood plasma levels of lipoperoxides, glutathione peroxidase, beta carotene, vitamin A and E in women with habitual abortion. *Cell Biochem Funct* 1998 Dec;16(4):227-31.
- Sinclair K, Lunn L, Kwong W, Wonnacott K, Linforth R, Craigon J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in-vitro embryo development. *Reproductive BioMedicine Online* 2008 2008;16(6):859-68.
- Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Age and uterine receptiveness: Predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Jul;90(7):4399-404.
- Stewart CJ, Iles RK, Perrett D. The analysis of human amniotic fluid using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001;22(6):1136-42.
- Suchanek E, Simunic V, Macas E, Kopjar B, Grizelj V. Prostaglandin F2 alpha, progesterone and estradiol concentrations in human follicular fluid and their relation to success of in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988 Aug;28(4):331-9.
- Suchocka Z, Swatowska J, Pachecka J, Suchocki P. RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum. *J Pharm Biomed Anal* 2006 9/11;42(1):113-9.

- Sugino N, Karube Harada A, Taketani T, Sakata A, Nakamura Y. Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F<sub>2</sub>α production through nuclear factor-κB activation via oxygen radicals in human endometrial stromal cells: Potential relevance to menstruation. 2004.
- Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H. Nuclear factor-κB is required for tumor necrosis factor-α-induced manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Aug;87(8):3845-50.
- Sugino N, Nakamura Y, Okuno N, Ishimatu M, Teyama T, Kato H. Effects of ovarian ischemia-reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biol Reprod* 1993 Aug;49(2):354-8.
- Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology* 2005;4(1):31-44.
- Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 2003 Jun;79(6):1288-93.
- Taghavi F, Habibi-Rezaei M, Amani M, Saboury AA, Moosavi-Movahedi AA. The status of glycation in protein aggregation. *Int J Biol Macromol* 2016 Jan 2.
- Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987 1 August 1987;256(2):677-86.
- Tamanini C, Basini G, Grasselli F, Tirelli M. Nitric oxide and the ovary. *2003;81(14\_suppl\_2):E1-7.*
- Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: Role of cumulus cells. *Biol Reprod* 2000 Sep;63(3):805-10.
- Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update* 2008 Mar-Apr;14(2):131-42.
- Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicarelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction* 2006 November 01;12(11):655-60.

- Tesarik J, Mendoza C. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: Oestrogen versus androgen antagonism. *Hum Reprod Update* 1997 Mar-Apr;3(2):95-100.
- Thomas N, Goodacre R, Timmins EM, Gaudoin M, Fleming R. Fourier transform infrared spectroscopy of follicular fluids from large and small antral follicles. *Hum Reprod* 2000;15.
- Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: New products and new perspectives. *Amino Acids* 2003 Dec;25(3-4):275-81.
- Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995 Jan;136(1):242-52.
- Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos* 1998;26(4):355-9.
- Tresguerres JAF. Capítulo 79: Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. In: *Fisiología humana*. 3ª ed. España: McGraw-Hill; 2005. .
- Tsafir A, Simon A, Margalioth EJ, Laufer N. What should be the first-line treatment for unexplained infertility in women over 40 years of age – ovulation induction and IUI, or IVF? *Reproductive BioMedicine Online* 2009;19, Supplement 4(0):47-56.
- Uchida K, Stadtman ER. Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 05/15;89(10):4544-8.
- Uehara S, Naganuma T, Tsuki A, Kyono K, Hoshiai H, Suzuki M. Relationship between follicular fluid steroid concentrations and in vitro fertilization. *Obstet Gynecol* 1985 Jul;66(1):19-23.
- Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:1-21.
- Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1982 15 February 1982;710(2):197-211.
- Valckx SD, De Pauw I, De Neubourg D, Inion I, Berth M, Fransen E, Bols PE, Leroy JL. BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Hum Reprod* 2012 Dec;27(12):3531-9.

- Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: Association with vascular endothelial growth factor levels and perfollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997 May;12(5):1047-55.
- Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, Meijer CJ, Niessen HW, Roos D. NADPH oxidase(s): New source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol* 2002 Aug;55(8):561-8.
- Van Voorhis BJ, Moore K, Strijbos PJ, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, Weiner CP. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. effects of gonadotropin stimulation in vivo. *J Clin Invest* 1995 Dec;96(6):2719-26.
- Vanderlelie J, Venardos K, Clifton VL, Gude NM, Clarke FM, Perkins AV. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2005 Jan;26(1):53-8.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 2013 Aug;47 Suppl 1:3-27.
- Von Wald T, Monisova Y, Hacker MR, Yoo SW, Penzias AS, Reindollar RR, Usheva A. Age-related variations in follicular apolipoproteins may influence human oocyte maturation and fertility potential. *Fertil Steril* 2010 5/1;93(7):2354-61.
- Wang P. Role of sex hormone receptors in ovulation. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005 March 2005;44(1):16-25.
- Wang TH, Chang CL, Wu HM, Chiu YM, Chen CK, Wang HS. Insulin-like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. *Fertil Steril* 2006 Nov;86(5):1392-401.
- Warren AY, Matharoo-Ball B, Shaw RW, Khan RN. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility. *Reproduction* 2005 October 01;130(4):539-44.
- Wen X, Perrett D, Patel P, Li N, Docherty SM, Tozer AJ, Iles RK. Capillary electrophoresis of human follicular fluid. *Journal of Chromatography B* 2009 12/1;877(31):3946-52.
- Wen X, Perrett D, Patel P, Li N, Docherty SM, Tozer AJ, Iles RK. Capillary electrophoresis of human follicular fluid. *Journal of Chromatography B* 2009 12/1;877(31):3946-52.



- Wen X, Tozer AJ, Butler SA, Bell CM, Docherty SM, Iles RK. Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertil Steril* 2006 Jun;85(6):1723-9.
- Wilson SR, Zucker PA, Huang RRC, Spector A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J Am Chem Soc* 1989 07/01;111(15):5936-9.
- Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L, Tureck RW, Mastroianni L, Lessey BA. Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in in vitro fertilization cycles: A 6-year data collection. *Fertility and Sterility* 1994 December 1994;62(6):1205-10.
- Wu YT, Wang TT, Chen XJ, Zhu XM, Dong MY, Sheng JZ, Xu CM, Huang HF. Bone morphogenetic protein-15 in follicle fluid combined with age may differentiate between successful and unsuccessful poor ovarian responders. *Reprod Biol Endocrinol* 2012 Dec 26;10:116,7827-10-116.
- Wu YT, Wu Y, Zhang JY, Hou NN, Liu AX, Pan JX, Lu JY, Sheng JZ, Huang HF. Preliminary proteomic analysis on the alterations in follicular fluid proteins from women undergoing natural cycles or controlled ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet* 2015 Mar;32(3):417-27
- Zamah AM, Hassis ME, Albertolle ME, Williams KE. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin Proteomics* 2015 Mar 3;12(1):5,015-9077-6. eCollection 2015.
- Zamberlam G, Portela V, de Oliveira JFC, Gonçalves PBD, Price CA. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in bovine ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2011 3/30;335(2):189-94.
- Zhou JY, Prognon P. Raw material enzymatic activity determination: A specific case for validation and comparison of analytical methods—The example of superoxide dismutase (SOD). *J Pharm Biomed Anal* 2006 3/18;40(5):1143-8.
- Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol Reprod* 1997 Dec;57(6):1413-9.
- Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol Reprod* 1997 Dec;57(6):1413-9.









## *ANEXO*









Manuscript Number: RBMO-D-16-00437R3

Title: Paraoxonase activities in human follicular fluid: role in follicular maturation

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Assisted reproduction: technology and outcomes

Keywords: paraoxonase; antioxidant; assisted reproduction; follicular fluid; ovarian stimulation.

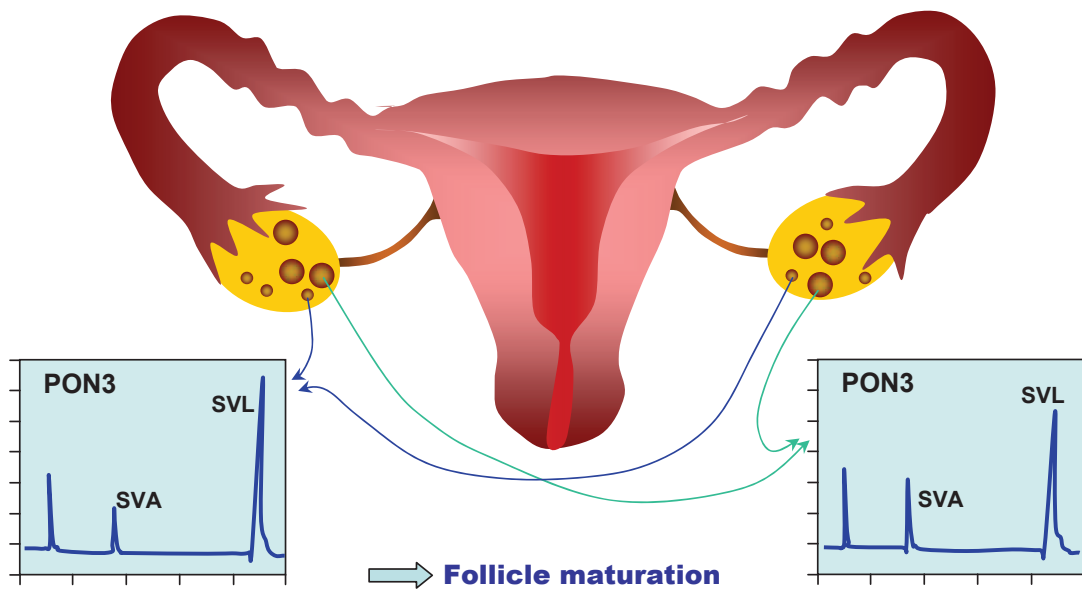
Corresponding Author: Dr. M. Begoña Ruiz-Larrea,

Corresponding Author's Institution: University of the Basque Country, UPV/EHU

First Author: Susana Meijide

Order of Authors: Susana Meijide; Irantzu Pérez-Ruiz; M. Luisa Hernández; Rosaura Navarro; Marcos Ferrando; Zaloa Larreategui; José-Ignacio Ruiz-Sanz; M. Begoña Ruiz-Larrea

Abstract: The paraoxonases (PONs) are antioxidant enzymes associated with beneficial effects against several diseases and some exposures. However, little is known on the role of PONs in human reproduction. This work was conducted to analyze whether there was any association between the activities of the PON enzymes (1, 2, and 3) with the follicular size and fertility parameters in assisted reproduction. The study included 100 subfertile women (patients) and 55 proven fertile women (oocyte donors), all subjected to a controlled ovarian stimulation cycle. Follicular fluid from small (diameter < 12 mm) and large (diameter ≥ 18 mm) follicles was collected from each woman. PON1 arylesterase and paraoxonase, PON2 methyl paraoxonase and PON3 simvastatinase activities from both donors and patients were significantly higher ( $P < .001$ ) in follicular fluid from large follicles compared with small ones. In large follicles PON3 activity was significantly higher ( $P < .01$ ) in donors compared with patients. There was a positive correlation between PON1 arylesterase and paraoxonase with the number of retrieved oocytes in donors. PONs were quantified in follicular fluid by immunoblotting. This is the first evidence of the increase in the activities of PONs with follicle size, thus providing indirect evidence for the role of PONs in follicle maturation.



## Paraoxonase activities in human follicular fluid: role in follicular maturation

1  
2 Susana Mejjide<sup>a</sup>, Irantzu Pérez-Ruiz<sup>a</sup>, M. Luisa Hernández<sup>a,b</sup>, Rosaura Navarro<sup>a,b</sup>, Marcos  
3 Ferrando<sup>c</sup>, Zaloa Larreategui<sup>c</sup>, José-Ignacio Ruiz-Sanz<sup>a,b\*</sup>, M. Begoña Ruiz-Larrea<sup>a,b\*</sup>  
4  
5

6  
7 *<sup>a</sup>Department of Physiology, Medicine and Nursing School, University of the Basque Country*  
8 *UPV/EHU, 48940-Leioa, Spain.*  
9

10  
11 *<sup>b</sup>BioCruces Health Research Institute. Plaza de Cruces s/n. 48903-Barakaldo, Spain.*  
12

13  
14 *<sup>c</sup>Valencian Institute of Infertility (IVI)-Bilbao, 48940-Leioa, Spain.*  
15

16  
17 \*Corresponding authors at: Department of Physiology, Medicine and Nursing School, University of  
18 the Basque Country, UPV/EHU. 48940 Leioa, Spain (E-mail: [mbego.ruizlarrea@ehu.eus](mailto:mbego.ruizlarrea@ehu.eus);  
19 [joseignacio.ruizs@ehu.eus](mailto:joseignacio.ruizs@ehu.eus))  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26  
27 Running title: PONs activities in follicle maturation  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## ABSTRACT

1  
2 The paraoxonases (PONs) are antioxidant enzymes associated with beneficial effects against several  
3 diseases and some exposures. However, little is known on the role of PONs in human reproduction.  
4  
5 This work was conducted to analyze whether there was any association between the activities of the  
6  
7 PON enzymes (1, 2, and 3) with the follicular size and fertility parameters in assisted reproduction.  
8  
9 The study included 100 subfertile women (patients) and 55 proven fertile women (oocyte donors),  
10  
11 all subjected to a controlled ovarian stimulation cycle. Follicular fluid from small (diameter < 12  
12  
13 mm) and large (diameter  $\geq$  18 mm) follicles was collected from each woman. PON1 arylesterase  
14  
15 and paraoxonase, PON2 methyl paraoxonase and PON3 simvastatinase activities from both donors  
16  
17 and patients were significantly higher ( $P < .001$ ) in follicular fluid from large follicles compared with  
18  
19 small ones. In large follicles PON3 activity was significantly higher ( $P < .01$ ) in donors compared  
20  
21 with patients. There was a positive correlation between PON1 arylesterase and paraoxonase with  
22  
23 the number of retrieved oocytes in donors. PONs were quantified in follicular fluid by  
24  
25 immunoblotting. This is the first evidence of the increase in the activities of PONs with follicle size,  
26  
27 thus providing indirect evidence for the role of PONs in follicle maturation.  
28  
29  
30  
31

32 *Keywords:* paraoxonase; antioxidant; assisted reproduction; follicular fluid; ovarian stimulation.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Introduction

1 Reactive oxygen species (ROS) and antioxidants are involved in the regulation of reproductive  
2 processes, such as the corpus luteum cycle, as well as changes in the endometrium, the follicular  
3 development, ovulation, fertilization, embryogenesis, embryo implantation and placental  
4 differentiation and growth (Al-Gubory et al., 2010; Shkolnik et al., 2011). In previous work we  
5 described that in subfertile women undergoing an IVF cycle, the treatment leading to the ovarian  
6 stimulation was associated with an increased production of ROS (Aurrekoetxea et al., 2010). Thus,  
7 serum resistance to *in vitro* oxidation, in terms of the lag time (time to attain the maximal oxidation  
8 rate), the total antioxidant capacity, and the levels of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol were significantly reduced  
9 at the end of the IVF cycle (at the ovarian stimulation stage) compared with the basal values at the  
10 beginning of the cycle, and the variation of the serum oxidation rate in the lag phase emerged as a  
11 predictor of pregnancy. In contrast, excessive ROS production has a negative impact on  
12 reproductive processes such as spontaneous abortions, embryopathies, preeclampsia or fetal growth  
13 restriction (Al-Gubory et al. 2010).

14 Differences in biochemical parameters occurring in reproductive tissues and fluids may be  
15 reflected in the systemic circulation. However, changes of these markers that take place in other  
16 tissues may mask the actual changes occurring in the gonads. Therefore, ovarian follicular fluid  
17 represents a better choice than the blood as a source for detecting these differences. The follicular  
18 fluid is in part an exudate of serum, since small proteins and lipoproteins can diffuse freely through  
19 the follicular wall, but the fluid also contains substances produced locally by follicular cells. High  
20 density lipoproteins (HDL) are the sole lipoprotein particles in human follicular fluid (Fujimoto et  
21 al., 2010), and provide cholesterol for *de novo* steroidogenesis (Li et al., 2001). In blood these  
22 lipoproteins also moderate the levels of free radicals by limiting oxidative damage of cells and other  
23 lipoproteins (Mackness and Durrington, 1995; Aviram and Rosenblat, 2004).

24 The paraoxonase (PON) gene family is composed of three members (PON1, PON2, and  
25 PON3) that share considerable structural homology and are located in tandem on chromosome 7 in  
26 humans, and exhibit antioxidative properties (Aviram and Rosenblat, 2004). PON1 is found in  
27 serum and circulates in blood bound to HDL. This enzyme hydrolyzes the oxon forms of several  
28 organophosphorus compounds used as insecticides (paraoxon, chlorpyrifos oxon, diazoxon), as well  
29 as nerve agents; however, the protection is significant only for diazoxon and chlorpyrifos oxon.  
30 Two polymorphisms in the coding region of the *PON1* gene have been thoroughly studied. Human  
31 PON1 displays a polymorphism at position 192 (Q192R) toward paraoxon, rendering enzyme  
32 alloforms with very different activities. The three phenotypic groups: QQ, QR, and RR, represent  
33 low, intermediate, and high PON1 paraoxonase activity, respectively (Richter et al. 2009).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Mackness et al. (1991) were the first to demonstrate that purified human PON1 could inhibit LDL oxidation *in vitro*. Other studies have reported that PON1 both prevents the formation of oxidized LDL and inactivates LDL-derived oxidized phospholipids once they are formed. PON1 also protects phospholipids in HDL and cells from lipid oxidative modifications (Negre-Salvayre et al., 2006; Costa et al., 2003). These data suggest that one physiological function of PON1 appears to be the metabolism of toxic oxidized lipids. PONs can also hydrolyze a number of lactone-containing pharmaceutical compounds (Draganov et al., 2005). PON2 and PON3 lack paraoxonase or arylesterase activities but are similar to PON1 in that both hydrolyze aromatic and long-chain aliphatic lactones. PON3 in particular hydrolyzes widely used drugs such as the statin lactones lovastatin and simvastatin (Draganov, 2007). Both PON2 and PON3 have antioxidant properties; PON3, similarly to PON1, is predominately expressed in the liver and is associated with HDL. PON2 is more widely distributed and provides antioxidant protection in the mitochondria and endoplasmic reticulum and outer membrane (Ng et al., 2001; Devarajan et al., 2011; Haggmann et al., 2014; Furlong et al., 2016). In this work we have determined the activities of the paraoxonases in follicular fluid from large and small follicles, in order to assess any possible role of PON activities in follicle growth, and we have also compared the activities from large follicles in patients with those of a control group (oocyte donors with proven fertility) in order to examine any relationship with fertility parameters in *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection (IVF/ICSI).

## Materials and methods

### Study design and study population

This is a prospective case-control study including 155 women that were recruited at the Valencian Institute of Infertility in Bilbao ([www.ivi.es](http://www.ivi.es), Vizcaya, Spain). The control group (Donor) comprised fertile women (with at least one child alive), who entered to the Egg Donor Program of the clinic (N=55), and the study group (Patient) were women with fertility problems, who went to the clinic to undertake an IVF/ICSI therapy (N=100). Criteria for participation in the study were: 1) no vitamin supplementation, 2) no cardiovascular medical history, 3) no hypertensive disorder, 4) no metabolic disease, 5) no polycystic ovary syndrome, and 6) no endometriosis.

Egg donors were women with these inclusion criteria: age 18-35 years, body mass index (BMI) 18-29 kg/m<sup>2</sup>, regular menstrual cycle of 26-35 days. The main exclusion criteria were: abnormal karyotype and recurrent miscarriage.

An additional cohort of eighteen women participated in the study to determine the relationship between serum and follicular fluid for PON1 and PON3 concentrations and activities.

All women underwent gonadotropin stimulation according to clinical protocol that has been previously described (Soares et al., 2005). Transvaginal ultrasonography and serum estradiol levels

were performed routinely during ovarian stimulation to assess ovarian follicle maturation. Follicular puncture was performed by transvaginal aspiration 36 h after hCG administration.

Antral follicle count (AFC) was the total number of follicles with a diameter between 2 and 10 mm in both ovaries on day 15 before the start of stimulation, as measured by transvaginal ultrasound. Clinical pregnancy was confirmed by measuring  $\beta$ -hCG concentrations and sonographic evidence of an intrauterine gestational sac after embryo transfer. Live birth was defined as a birth of an infant as a result of an ovarian stimulation cycle. In this study, a multiple pregnancy was regarded as one pregnancy.

#### Sample collection

In each patient, follicular fluid from large (diameter  $\geq$  18 mm), and small follicles (diameter < 12 mm) were obtained. The follicular fluids from two contralateral follicles of the same size were individually aspirated. Follicle flushing was not performed. Fluids were visually tested for blood contamination and samples contaminated with blood were discarded. Immediately after removal of the oocytes, the two samples of the same size were pooled and centrifuged at 3000 g for 10 min to remove debris and granulose cells. The follicular fluid supernatant was then transferred to sterile polypropylene tubes and stored in liquid nitrogen. The tubes were carried to the university maintaining the cold-chain, and kept at -80 °C until analysis. The *Free Radicals and Oxidative Stress (FROS)* research group of the university ([www.ehu.es/radicaleslibres/](http://www.ehu.es/radicaleslibres/)) was responsible for the biochemical analyses and was blinded to the clinical outcomes during the assay procedures. At the moment of oocyte retrieval, serum and follicular fluid were obtained from the same woman.

#### Ethical approval

The Ethics Committee of the University UPV/EHU (Ethics Committee for Research involving Human Subjects, CEISH) approved the human subject protocols (CEISH/96/2011/RUIZLARREA, M30\_2015\_187\_RUIZ LARREA), and the study was performed according to the UPV/EHU and IVI-Bilbao agreements, Ref. 2012/01 and IVI\_02\_2015 RUIZ LARREA. The project complies with the Spanish Law of Assisted Reproductive Technologies (14/2006). Written informed consent was obtained from all trial subjects for participation in the study.

#### PON1 activities

Due to the wide range of substrates PON1 is able to hydrolyze, different methods for determining PON1 activity have been described in the current literature. In this study, both paraoxonase activity (using diethyl p-nitrophenyl phosphate –paraoxon– as substrate) and arylesterase activity (using phenylacetate as substrate) were analyzed. The enzyme activities were measured spectrophotometrically based on the method described by Furlong et al. (1989) adapted to 96-well plates. All reactions were performed in triplicate.

### *PON1 paraoxonase activity*

Forty microliters of follicular fluid 1:20 diluted in buffer was added per well to 60  $\mu$ l of working buffer (225 mM Tris-HCl, 2.25 mM CaCl<sub>2</sub>, and 2.14 M NaCl, pH 8.5). The reaction was started by the addition of 100  $\mu$ l of 6 mM paraoxon (200  $\mu$ l final volume). The reaction was followed at 37 °C by monitoring the change in absorbance at 405 nm every 52 seconds for 12 min. Blanks were included to correct for the spontaneous hydrolysis of paraoxon. Reaction rates were derived from the corresponding slopes. Results were expressed as nmol/min/ml by applying the experimental molar extinction coefficient of 10.104 mM<sup>-1</sup> for *p*-nitrophenol.

### *PON1 arylesterase activity*

Forty microliters of follicular fluid diluted 1:500 in buffer was added per well to 60  $\mu$ l of the reaction buffer (9 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8). The reaction was started by the addition of 100  $\mu$ l of 24 mM phenyl acetate in the reaction buffer (200  $\mu$ l total volume). The reaction was followed at 37 °C by monitoring the change of absorbance at 270 nm every 50 seconds for 10 min. Blanks were included to correct for the spontaneous hydrolysis of phenyl acetate. Reactions rates were derived from the corresponding slopes and the results were expressed as  $\mu$ mol/min/ml by applying the experimental molar extinction coefficient of 0.8197 mM<sup>-1</sup> for phenol.

### *Paraoxonase to arylesterase ratio*

PON1 phenotype can be determined by kinetic enzyme assays. The paraoxonase/arylesterase ratio was calculated for each woman, and this ratio was used to classified PON1 192 phenotypes (Eckerson et al., 1983).

### PON2 activity

PON2 activity was determined using methyl paraoxon as the substrate. PON2 methyl paraoxonase activity was measured spectrophotometrically by a method adapted to 96-well plates. The reaction buffer consisted of 225 mM Tris-HCl, 2.25 mM CaCl<sub>2</sub>, and 2.14 mM NaCl, pH 8.5. Forty microliters of follicular fluid 1:20 diluted in buffer was added to 60  $\mu$ l of reaction buffer per well in triplicate. Blanks were included to correct for the spontaneous hydrolysis of methyl paraoxon. The reaction started by the addition of 100  $\mu$ l of 6 mM methyl paraoxon (200  $\mu$ l total volume). The reaction was followed at 37 °C by monitoring the change of absorbance at 405 nm every 52 seconds for 12 min. Reactions rates were derived from the corresponding slopes. Results were expressed as nmol/min/ml by applying the experimental molar extinction coefficient of 10.104 mM<sup>-1</sup> for *p*-nitrophenol.

### PON3 activity

The determination of PON3 activity was carried out according to Suchocka et al. (2006) with modifications to adapt the method to follicular fluid samples. The PON3 protein does not show the capacity to hydrolyze paraoxon and has a very low arylesterase activity; however, the enzyme



1 exhibits lactonase activity on lovastatin and simvastatin compounds. The method measures the  
2 lactonase activity of PON3 using simvastatin lactone (SVL) as substrate. PON3 converts simvastatin  
3 lactone to its acid form ( $\beta,\delta$ -dihydroxyacid simvastatin, SVA). Both the substrate (SVL) and product  
4 (SVA) of the reaction were separated by reverse-phase HPLC and the reaction rate was estimated by  
5 the product UV-quantitation (see “Supplemental Material”).  
6

7 The intra- and interassay coefficients of variation (CV) for the enzyme activities were as  
8 follow: 2.9% and 5.4% for PON1 paraoxonase, 2.3% and 5.1% for PON1 arylesterase, 3.0% and  
9 5.2% for PON2 methyl paraoxonase, and 6.4% and 8.6% for PON3 simvasatatinase. The minimal  
10 levels of quantitative detection were 500 nmol/min/ml for PON1 arylesterase, 60 nmol/min/ml for  
11 PON1 paraoxonase, 10 nmol/min/ml for PON2, and 0.2 nmol/min/ml for PON3 activity.  
12  
13

#### 14 Low-abundance protein enrichment from follicular fluid 15 16

17 The presence of major proteins (for example, albumin) in follicular fluid makes the detection of  
18 minority proteins (PON2) extremely challenging. Before the analysis of PON2 by western blot,  
19 follicular fluid samples were processed with the ProteoMiner Protein Enrichment Large-Capacity  
20 commercial kit (Bio-Rad, Madrid, Spain). The columns contained in the kit remove a large  
21 proportion of the major proteins in a complex mixture, which facilitates the detection of less  
22 abundant proteins. The sample is mixed with the column-containing mixture of hexapeptides  
23 attached to chromatographic beads. Major proteins rapidly saturate their hexapeptide ligands, and  
24 excess proteins can be washed, while minor proteins remain bound to their ligands by concentrating  
25 on the chromatographic support. The procedure was performed as indicated by the manufacturer.  
26 The storage solution of the column was removed and the column was washed twice with phosphate-  
27 buffered saline (150 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, washing buffer). Follicular fluid (1.8  
28 ml) was applied to the column, and remained rotating for 2 h at room temperature. Afterwards, the  
29 column was washed twice with washing buffer to remove the excess of unbound proteins. Finally,  
30 the proteins bound to the ligands were eluted by the addition of 200  $\mu$ l of 4 M urea, 1% CHAPS,  
31 and 5% acetic acid.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

#### 47 PON1, PON2 and PON3 quantification by western blot

48 Enriched and non-enriched follicular fluid samples, serum and human recombinant PON1, PON2  
49 (ProsPec-Tany TechnoGene Ltd., Ness Ziona, Israel), and PON3 proteins (ThermoFisher Scientific,  
50 Waltham, MA, USA) were denatured in Laemmli buffer 5x (300 mM Tris-HCl, 50% glycerol, 10%  
51 sodium dodecylsulfate, 250 mM dithiothreitol, and 0.01% bromophenol blue, pH 6.8) (Laemmli  
52 1970). Proteins were separated by vertical slab gel electrophoresis with a resolving gel of 12%  
53 polyacrylamide and a stacking gel of 4% polyacrylamide under denaturing conditions in 25 mM  
54 Tris-HCl, pH 8.3, buffer containing 192 mM glycine and 0.1% SDS. Electrophoresis was developed  
55 for 90 min at constant voltage of 175 V for PON1, and 240 min at a constant voltage of 100 V for  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

PON2 and PON3. In order to analyze PON1, after electrophoresis, the separated proteins were transferred onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Spain) by electroblotting in a semi-dry transfer device (Bio-Rad, Madrid, Spain) with constant amperage (1 mA/cm<sup>2</sup>) for 1 hour. In the case of PON2 and PON3, a wet transfer was performed; proteins were transferred onto PVDF membranes in a mini trans-blot module (Bio-Rad, Madrid, Spain) with constant voltage (26 V) for 16 h at 4 °C. After blocking for 1 h at room temperature in TTBS buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05% Tween20) and 5% skimmed, membranes were incubated overnight at 4 °C with the corresponding primary antibody (R&D System, Abingdon, UK) at dilutions of 7:7000, 6:7000 and 6:7000 for the detection of PON1, PON2 and PON3, respectively. After extensive washing in TTBS to remove the residual primary antibody, membranes were probed with the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (R&D System, Abingdon, UK) for 1 h at room temperature. The immunoreactive proteins were detected by incubation with the Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Madrid, Spain), and the blots were imaged by scanning with the C-DiGit LI-COR blot scanner (Bonsai Advanced Technologies, Madrid, Spain). Quantitative data were derived from the corresponding standard curve on each electroblotting. No cross-reactivity was observed for the PON antibodies (Fig. 1).

#### Statistical analyses

Sample size was calculated for a significance level of 5% and a power higher than 80% to detect a difference between means higher than 15%. StatMate for Windows (GraphPad Software, USA) was used for sample size calculations. Univariate descriptive statistics (mean, standard deviation, and frequency) and bivariate (Student's t test, Mann-Whitney and Wilcoxon) were performed. Statistical comparisons for categorical variables were performed using the Chi-square test. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess if the variables followed a normal distribution. The Student's t test for independent samples and its non-parametric equivalent (Mann-Whitney) were applied to compare the Donor and Patient groups in terms of anthropometric and biochemical variables. The Student's t test for paired samples and the Wilcoxon test (nonparametric equivalent) were applied to compare large and small follicles within each group (Donor and Patient), and between serum and follicular fluid. Associations among quantitative variables were analyzed using the Pearson's correlation coefficient. All of the tests were bilateral, with a significance level of  $P < .05$ . Stepwise forward multiple linear regression analysis was used for the evaluation of group, age, body mass index, number of retrieved oocytes, and fertilization rate as predictors of the intrafollicular PON3 activity.

## Results

1 The characteristics of the study population are shown in Table 2. The mean age of the patients was  
2 significantly higher than that of the donors ( $P<.001$ ). The body mass index was similar in both  
3 groups. As regards smoking habits, no differences were found in the percentage of smokers between  
4 donors and patients. Among the patients, the infertile etiology included 9.8% recurrent pregnancy  
5 loss, 4.9% tubal factor, and 6.9% genetic factor. Unexplained infertility was 78.4%. Some type of  
6 male infertility in combination with other causes was found in 58% of the cases.  
7

8 After an ovarian stimulation cycle, large and small follicles were obtained from each woman,  
9 and the follicular fluid was separated from oocytes. The different activities of PON1, PON2, and  
10 PON3 were measured in follicular fluid from follicles of both sizes (Fig. 2). There were no  
11 statistically significant differences in PON activities between smokers and non-smokers, so this  
12 criterion was not considered for subsequent comparisons. Arylesterase showed the highest activity,  
13 three orders of magnitude higher than paraoxonase, methyl-paraoxonase, and simvastatinase  
14 activities. Highly significant differences depending on the follicle size were found for all studied  
15 PON activities. In all cases the activities were markedly higher in large follicles, compared to small  
16 ones, suggesting a role for PON in ovarian follicle maturation. In the case of PON3, very significant  
17 differences were found between donors and patients for large follicles ( $P<.01$ ), with PON3 activity  
18 being 20.7% higher in donors than in patients ( $16.3 \pm 1.0$  versus  $13.5 \pm 0.5$  nmol/min/ml). Values  
19 remained significantly different after adjusting for age, body mass index, number of retrieved  
20 oocytes, and fertilization rate (Table 3).  
21

22 The phenotype distribution of the Q192R polymorphism of PON1 was analyzed. The  
23 cumulative distribution of women with respect to the ratio of paraoxonase/arylesterase activity  
24 revealed a trimodal distribution, in which the three QQ (ratio  $<2.0$ ), QR (ratio  $\geq 2.0$  and  $<6.0$ ), and  
25 RR (ratio  $\geq 6.0$ ) genotypes could be assigned (Fig. 3). The distribution of the phenotypes was not  
26 significantly different between donors (43.6% QQ, 47.3% QR, and 9.1% RR) and patients (45.4%  
27 QQ, 45.4% QR, and 9.2% RR). The polymorphism clearly showed an influence on the paraoxonase  
28 activity, with an increasing activity in the order  $QQ<QR<RR$  (Fig. 4). However, when the effect of  
29 the polymorphism was taken into account, no significant differences were found between donors  
30 and patients (Fig. 5).  
31

32 We identified and quantified PON proteins in follicular fluid by western blot. As described in  
33 Materials and Methods, PON2 was quantified after depletion of high abundant proteins in follicular  
34 fluid samples. On each gel a standard curve was derived from increasing concentrations of human  
35 recombinant proteins expressed in *E. coli*, all of them with an additional His-tag. The apparent  
36 molecular weights for PON proteins in follicular fluid calculated from the blots using molecular  
37 weight markers were 45 kD (PON1), 42 kD (PON2), and 39 kD (PON3). Theoretical values for  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 these proteins vary from 38 to 39.7 kDa. The higher molecular weight for PON1 in follicular fluid  
2 responds to the extensive post-translational modifications (Marsillach et al., 2010). Data derived  
3 from glycoproteomic analysis suggest some glycosylation in PON2 and PON3 (Liu et al. 2005;  
4 Chen et al. 2009). Results revealed that PON1 was the most abundant protein, about fifteen times  
5 more concentrated than PON3, and 1,500-fold than PON2 (Fig. 6).  
6  
7

8 Since PON1 and PON3 are proteins secreted in the blood and follicular fluid is in part a  
9 plasma exudate, these proteins were quantified in both serum and follicular fluid from the same  
10 woman, and the enzyme activities were analyzed, as well. Results indicated that there were no  
11 statistically significant differences in the concentration of PON1 between serum and follicular fluid  
12 (Fig. 7). However, the amount of PON3 was markedly higher in serum than in follicular fluid.  
13 Regarding enzyme activities, PON1 arylesterase and paraoxonase significantly increased in serum  
14 compared with follicular fluid ( $p < 0.001$ ). In the case of PON3, despite its higher concentration in  
15 serum, no differences in simvastatinase activity were found between both fluids (Fig. 8).  
16  
17

18 Oocytes were harvested and the total and metaphase II (MII)-stage oocytes were counted.  
19 Most of matured oocytes were subjected to ICSI (59%) or mixed ICSI/IVF (15%), while the rest  
20 (26%) were cryopreserved by vitrification (Martínez-Burgos et al. 2011). The fertility parameters  
21 are shown in Table 3. As expected, the mean antral follicle count (AFC) was higher in donors than  
22 in patients ( $P < .001$ ). Correlation analysis showed that AFC was positively correlated with the  
23 number of retrieved oocytes ( $R = 0.445$ ,  $P < .001$ ) and MII-stage oocytes ( $R = 0.448$ ,  $P < .001$ ), and  
24 inversely with the woman's age ( $R = -0.409$ ,  $P < .001$ ). The mean number of retrieved oocytes and  
25 MII-stage oocytes were markedly higher ( $P < .001$ ) in donors than in patients. However, the  
26 fertilization rate was similar in both populations (Table 3).  
27  
28

29 Pearson's correlation analyses were performed in order to study possible associations between  
30 the biochemical parameters and fertility outcomes. Only those correlations that were statistically  
31 significant in the donor and patient populations are shown in Fig. 9. In donors, positive correlations  
32 ( $P < .05$ ) were found between PON1 arylesterase and paraoxonase activities with the total number of  
33 retrieved oocytes. Values adjusted for age gave the same statistical significances. These correlations  
34 were lost in the patient population. In this group none of the activities of the PON system differed  
35 depending on the pregnant condition; around 50% of women receiving an embryo transfer became  
36 pregnant after only one IVF cycle.  
37  
38

## 39 Discussion

40 The major aim of this work was to examine the role of the PONs in the follicular fluid in relation to  
41 follicle maturation, and compare these markers in subfertile women with those in a control group  
42 (oocyte donors with proven fertility) in order to establish any relationship with fertility parameters  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

in IVF/ICSI. Follicular size and serum concentration of oestradiol are commonly used as indicators of oocyte maturity, and larger follicles yield oocytes with increased developmental capacity and fertilization rate than those yielded by smaller follicles in IVF (Ectors et al., 1997; Bergh et al., 1998). The fluid from large follicles is distinct in biochemical nature from that from small follicles, probably reflecting differences in the maturational stage of the follicles (Thomas et al. 2000). In the present work, we report that PON1 paraoxonase and arylesterase activities, PON2 methyl paraoxonase, and PON3 simvastatinase were significantly higher in the follicular fluid of large follicles compared with small ones both from fertile and subfertile women. Moreover, PON3 activity was dramatically higher in follicular fluid from fertile women than from subfertile ones. These data provide evidence for a possible role of the PONs in follicle development. To the best of our knowledge, this is the first study focusing on the measurement of PON activities in relation to this aspect of human reproduction. In a pilot study, the group of Browne et al. (2008) analyzed the PON1 and PON3 activities in human follicular fluid in connection with HDL particles contained in this ovary fluid, and suggested a role for PON arylesterase activity in early embryo development. In the present study we report in the donor population a clear correlation between PON1 arylesterase and paraoxonase activities with the number of retrieved oocytes. Certain antioxidants (such as melatonin) in the growing follicle may be important factors in avoiding atresia, and, thus, allowing follicle growth and, therefore, oocyte growth (Cruz et al., 2014). Perhaps the different antioxidant status, particularly PON3 antioxidant activity, in the follicles between the donor and patient groups could account for the different correlation findings on the studied populations. Oocyte growth involves an increase in the number of mitochondria, where oxidative phosphorylation takes place in order to produce the required energy for oocyte maturation from the germinal vesicle stage (Eichenlaub-Ritter et al., 2011). Mitochondria are the main organella responsible of ROS production in the cells, so that ROS generation must be tightly controlled by antioxidant systems. Remarkably, both PON2 and PON3 proteins have been detected in mitochondria (Devarajan et al., 2011; Schweiket et al., 2012). Oxidative stress in the oocytes caused by excess ROS must be limited in order for a good embryo to be produced. The present data show associations that do not necessarily imply causal effect; thus, further studies with humans and mammals are needed to establish causality.

To what extent the differences found in PON activities between small and large follicles are not due to an increased vascularization during follicle maturation are not actually known. In a parallel study we have characterized the activities and mass expression of the extracellular PON1 and PON3 proteins, and showed no correlations of the enzymes concentrations and activities between the two fluids. These results on PONs expression suggest that the activities determined in the present report do not simply reflect an increased HDL infiltration rate, but indicate that PON1 and PON3 are subjected to strict control in the follicular fluid. PON2 was also detected in follicular

1 fluid. Using a proteomic approach Angelucci et al. (2006) identified PON1 and other proteins with  
2 antioxidant activities in relatively high amounts in follicular fluid of normovulatory women. The  
3 authors suggest that these enzymes probably assist in the protection of the follicle from oxidative  
4 stress during ovulation. Recently, it has been reported the expression of the three PON isoenzymes  
5 in granulosa cells of dairy cows (Schneider et al. 2013), although so far there are no data concerning  
6 PONs expression in these ovary cells in women.  
7

8  
9 One limitation of the present study is the use of pooled follicular fluid, losing the presumed  
10 variability of the analyzed biochemical parameters between individual follicles. However, in all  
11 cases the samples came from the same number of follicles, and the measured enzyme activities have  
12 an estimated variability between women higher than between follicles (Bloom et al., 2014). The  
13 observed intrafollicular changes detected in the PON antioxidant system with follicular maturation  
14 would assess the normal oocyte development inside the follicle. One advantage of this work is that  
15 each sample from large and small follicles came from the same woman, i.e. the statistical analysis  
16 has been performed for paired data, thus reducing the variability of mean values when independent  
17 groups with different subjects are used.  
18

19  
20 No significant differences in intrafollicular PON1 mean activities were found between donors  
21 and patients. This lack of differences was not due to a dissimilar frequency of the PON1 Q192R  
22 polymorphism between both populations. Regarding the statistically significant differences found  
23 for PON1 activities between small and large follicles, these changes are independent on the  
24 polymorphism, since follicle samples of different sizes came from the same woman.  
25

26  
27 Previous reports in the literature have shown the relationship between the paraoxonases and  
28 diseases such as atherosclerosis, hypercholesterolemia and obesity, attributed to their antioxidant  
29 activity against lipid oxidation (Martinelli et al., 2012; Krzystek-Korpacka et al., 2013; Abelló et  
30 al., 2014). However, little is known on the role of the antioxidant PON enzymes in reproduction and  
31 female infertility. The physiological roles of PONs may include the detoxification of lactones  
32 (exogenous or endogenous lactones derived from oxidized lipids) and organophosphates, although  
33 the physiological substrate(s) of PONs are unknown. It has been shown that purified recombinant  
34 human PONs hydrolyze estrogen esters at position 3 of the steroid A-ring. Estrogen esters are  
35 substrates for the PONs and are very efficiently hydrolyzed, particularly by PON3 (Teiber et al.,  
36 2007). In addition to the key role as hormones, estrogens can act as antioxidants (Moosmann and  
37 Behl, 1999; Borrás et al. 2010). Nevertheless, they require a free phenolic hydroxyl group to exhibit  
38 their antioxidant properties, the corresponding 3-esters having a dramatically reduced antioxidant  
39 activity (Tikkanen et al., 2002). The ability of PONs to hydrolyze esters of phenolic compounds  
40 will result in their conversion to more potent antioxidant species and this may represent a potential  
41 mechanism by which PON1/3 could confer antioxidant properties to HDL, the lipoprotein particle  
42 present in follicular fluid. Moreover, the mean estradiol ester concentration in follicular fluid in  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 pregnancy is higher than 100 nmol/l, a much higher amount than that reported in plasma, where it  
2 varied from 40 pmol/l (first trimester) to 400 pmol/l (third trimester) (Vihma et al., 2001; Lerner et  
3 al., 1993). It has been proposed that PONs may hydrolyze estrogen 3-esters, which are likely to be  
4 sequestered by HDL due to their hydrophobic nature, resulting in the unmasking of their antioxidant  
5 capacity (Teiber et al., 2007).  
6

7 The role of PON2 in physiology has been poorly documented, though there is evidence  
8 relating its presence with the control of mitochondrial ROS production (Devarajan et al., 2011) and  
9 neuroprotection (Giordano et al., 2013). PON2 also acts as a chain breaking agent in the  
10 propagation step of lipid peroxidation at the cell membrane (Hagmann et al., 2014). As it has been  
11 mentioned above, PON2 is an intracellular protein in various cell types. In our study, PON2 was  
12 detected at very low concentrations in follicular fluid. Although it has been reported that methyl  
13 paraoxonase activity is more specific for PON2 than PON1 (Bar-Rogovsky et al. 2013), the low  
14 intrafollicular PON2 concentration makes it possible that the detected methyl paraoxonase activity  
15 could be ascribed to PON1. Most data on PON3 are related to its role in the prevention of LDL  
16 oxidation, with a minor attention of PON3 in fertility. However, disruption of the *Pon3* gene causes  
17 embryonic lethality in mice (Kempster et al., 2012).  
18

19 It has been reported that hyperhomocysteinemia may affect the reproductive process within  
20 various levels (Ocal et al., 2012). The major cause of homocysteine (Hcy) toxicity is thought to be  
21 Hcy metabolites. Specifically Hcy-thiolactone, whose synthesis increases with an increase in Hcys  
22 levels, is a reactive metabolite that causes protein N-homocysteinylation, thus impairing protein  
23 function (Jakubowski, 2010). Under physiological conditions, PONs degrade Hcy-thiolactone,  
24 among other compounds (She et al., 2012). The Hcy-thiolactonase activity of PON is a determinant  
25 of plasma N-Hcy-protein levels, leading to the conclusion that PON protects proteins against N-  
26 homocysteinylation *in vivo* (Perla-Kajan and Jakubowski, 2010). The reported differences in  
27 intrafollicular PON status in this paper and the possible role that these enzymes play in the follicular  
28 fluid protection from Hcy-triggered toxicity and the outcomes in reproduction needs to be  
29 unravelled.  
30

31 From the present study, significant differences in age were observed between donors and  
32 patients, fertile women being significantly younger than patients. The PON1 paraoxonase activity  
33 from plasma and serum has been reported to vary with age (Milochevitch and Khalil, 2001; Seres et  
34 al., 2004). Serum PON1 paraoxonase significantly decreased with age, while the enzyme  
35 concentration in the serum remained unchanged (Seres et al., 2004). In our study, no correlations  
36 were observed between follicular fluid PON1 activities (arylesterase or paraoxonase) and the age  
37 (range of the study, 19-46 years). In the work described by Seres et al. (2004), the recruited  
38 population was aged between 22 and 89 years, thus being a wide range to observe differences in  
39 PON1 paraoxonase which could be related to the development of oxidative stress conditions with  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

aging. When adjusted for age, we found very significant variations of follicular PON3 activity between donors and patients, with PON3 simvastatinase activity being lower in patients, ruling out the age as the explaining factor for PON3 activity differences.

In conclusion, this is the first report showing that the activities of PONs are increased in large follicles compared with small ones from either fertile or subfertile women undergoing a controlled ovarian stimulation cycle. From the data shown, a role of PONs in follicle maturation can be drawn. The activity of PON3 was higher in follicles from fertile women than from patients, thus suggesting the involvement of the enzyme in fertility. PON1 activities were associated with the number of total oocytes, providing indirect evidence of the involvement of the redox balance in follicle growth.

### Acknowledgements

This work was supported by the “PN de I+D+I” of the Spanish Ministry of Science and Innovation, “ISCIII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación” and FEDER (ref. FIS/FEDER PI11/02559), the Basque Government (Dep. Education, Universities and Research, ref. IT687-13), and UPV/EHU (CLUMBER UFI11/20 and PES13/58). SM was awarded predoctoral fellowships from Fundación Jesús Gangoiti-Barrera. IP was awarded a predoctoral fellowship from Gobierno Vasco.

### References

- Abelló, D., Sancho, E., Camps, J., Joven, J., 2014. Exploring the role of paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease: a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20997–21010.
- Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A., Garrel, C., 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42, 1634–1650.
- Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G.M., Giampietro, F., Palumbo, P., Di Ilio, C., 2006. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1775–1785.
- Aurrekoetxea, I., Ruiz-Sanz, J.I., Ruiz del Agua, A., Navarro, R., Hernandez, M.L., Matorras, R., Prieto, B., Ruiz-Larrea, M.B., 2010. Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 94, 1279–1286.
- Aviram, M., Rosenblat, M., 2004. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1304–1316.
- Bar-Rogovsky, H., Hugenmatter, A., Tawfik, D.S., 2013. The evolutionary origins of detoxifying enzymes: the mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *J. Biol. Chem.* 288, 23914–23927.



- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Bergh, C., Broden, H., Lundin, K., Hamberger, L., 1998. Comparison of fertilization, cleavage and pregnancy rates of oocytes from large and small follicles. *Hum. Reprod.* 13, 1912–1915.
- Bloom, M.S., Kim, K., Fujimoto, V.Y., Browne, R.W., 2014. Variability in the components of high-density lipoprotein particles measured in human ovarian follicular fluid: a cross-sectional analysis. *Fertil. Steril.* 101, 1431–1440.
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V., Viña, V., 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802, 205–211.
- Browne, R.W., Shelly, W.B., Bloom, M.S., Ocque, A.J., Sandler, J.R., Huddleston, H.G., Fujimoto, V.Y., 2008. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. *Hum. Reprod.* 23, 1884–1894.
- Chen, R., Jiang, X., Sun, D., Han, G., Wang, F., Ye, M., Wang, L., Zou, H., 2009. Glycoproteomics analysis of human liver tissue by combination of multiple enzyme digestion and hydrazide chemistry. *J. Proteome Res.* 8, 651–661
- Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2003. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu. Rev. Med.* 54, 371–392.
- Cruz, M.H., Leal, C.L., Cruz, J.F., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2014. Essential actions of melatonin in protecting the ovary from oxidative damage. *Theriogenology* 82, 925–932.
- Devarajan, A., Bourquard, N., Hama, S., Navab, M., Grijalva, V.R., Morvardi, S., Clarke, C.F., Vergnes, L., Reue, K., Teiber, J.F., Reddy, S.T., 2011. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal* 14, 341–351.
- Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B.N., 2005. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid Res.* 46, 1239–1247.
- Draganov, D.I., 2007. Human PON3, effects beyond the HDL: clues from human PON3 transgenic mice. *Circ. Res.* 100, 1104–1105.
- Eckerson, H.W., Wyte, C.M., La Du, B.N., 1983. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 35, 1126–1138.
- Ectors, F.J., Vanderzwalmen, P., Van Hoeck, J., Nijs, M., Verhaegen, G., Delvigne, A., Schoysman, R., Leroy, F., 1997. Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 12, 2002–2005.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Eichenlaub-Ritter, U., Wieczorek, M., Lüke, S., Seidel, T., 2011. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 11, 783–96.
- Fujimoto, V.Y., Kane, J.P., Ishida, B.Y., Bloom, M.S., Browne, R.W., 2010. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. *Hum. Reprod. Update* 16, 20–38.
- Furlong, C.E., Richter, R.J., Seidel, S.L., Costa, L.G., Motulsky, A.G., 1989. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal. Biochem.* 180, 242–247.
- Furlong, C.E., Marsillach, J., Jarvik, G.P., Costa, L.G., 2016. Paraoxonases-1, -2, and -3: What are their functions? *Chem. Biol. Interact.* 259, 51–62.
- Giordano, G., Tait, L., Furlong, C.E., Cole, T.B., Kavanagh, T.J., Costa, L.G., 2013. Gender differences in brain susceptibility to oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 expression. *Free Radic. Biol. Med.* 58, 98–108.
- Hagmann, H., Kuczkowski, A., Ruehl, M., Lamkemeyer, T., Brodesser, S., Horke, S., Dryer, S., Schermer, B., Benzing, T., Brinkkoetter, P.T., 2014. Breaking the chain at the membrane: paraoxonase 2 counteracts lipid peroxidation at the plasma membrane. *FASEB J.* 28, 1769–1779.
- Jakubowski, H., 2010. The role of paraoxonase 1 in the detoxification of homocysteine thiolactone. *Adv. Exp. Med. Biol.* 660, 113–127.
- Kempster, S.L., Belteki, G., Licence, D., Charnock-Jones, D.S., Smith, G.C., 2012. Disruption of paraoxonase 3 impairs proliferation and antioxidant defenses in human A549 cells and causes embryonic lethality in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E103–E107.
- Krzystek-Korpacka, M., Patryn, E., Hotowy, K., Czapińska, E., Majda, J., Kustrzeba-Wójcicka, I., Noczyńska, A., Gamian, A., 2013. Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Adv. Clin. Exp. Med.* 22, 229–236.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227, 680–685.
- Larner, J.M., Pahuja, S.L., Shackleton, C.H., McMurray, W.J., Giordano, G., Hochberg, R.B., 1993. The isolation and characterization of estradiol-fatty acid esters in human ovarian follicular fluid. Identification of an endogenous long-lived and potent family of estrogens. *J. Biol. Chem.* 268, 13893–13899.
- Li, X., Peege, H., Menon, K.M., 2001. Regulation of high density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid expression and cholesterol transport in theca-interstitial cells by insulin and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 142, 174–181.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Liu, T., Qian, W.J., Gritsenko, M.A., Camp, D.G. 2<sup>nd</sup>, Monroe, M.E., Moore, R.J., Smith, R.D., 2005. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 4, 2070-2080.
- Mackness M.I., Arrol S., Durrington P.N., 1991. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286, 152-154.
- Mackness, M.I., Durrington, P.N., 1995. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 115, 243-253.
- Marsillach, J., Aragonès, G., Mackness, B., Mackness, M., Rull, A., Beltrán-Debón, R., Pedro-Botet, J., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Camps, J., 2010. Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids Health Dis.* 9, 46.
- Martinelli, N., Micaglio, R., Consoli, L., Guarini, P., Grison, E., Pizzolo, F., Friso, S., Trabetti, E., Pignatti, P.F., Corrocher, R., Olivieri, O., Girelli, D., 2012. Low levels of serum paraoxonase activities are characteristic of metabolic syndrome and may influence the metabolic-syndrome-related risk of coronary artery disease. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 1-9.
- Martínez-Burgos, M., Herrero, L., Megías, D., Salvanes, R., Montoya, M.C., Cobo, A.C., Garcia-Velasco, J.A., 2011. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil. Steril.* 95, 374-377.
- Milochevitch, C., Khalil, A., 2001. Study of the paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 65, 241-246.
- Moosmann, B., Behl, C., 1999. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 8867-8872.
- Negre-Salvayre, A., Dousset, N., Ferretti, G., Bacchetti, T., Curatola, G., Salvayre, R., 2006. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1031-1040.
- Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Reddy, S.T., 2001 Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 276, 44444-44449.
- Ocal, P., Ersoylu, B., Cepni, I., Guralp, O., Atakul, N., Irez, T., Idil, M., 2012. The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 299-304
- Perla-Kajan, J., Jakubowski, H., 2010. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylolation in humans. *Faseb J.* 24, 931-936.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56
- Richter, R.J., Jarvick, G.P., Furlong, C.E. 2009. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 1–9.
- Schneider, A., Absalon-Medina, V.A., Esposito, G., Corrêa, M.N., Butler, W.R., 2013. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 989-994.
- Schweikert, E.M., Devarajan, A., Witte, I., Wilgenbus, P., Amort, J., Förstermann, U., Shabazian, A., Grijalva, V., Shih, D.M., Farias-Eisner, R., Teiber, J.F., Reddy, S.T., Horke, S., 2012. PON3 is upregulated in cancer tissues and protects against mitochondrial superoxide-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 19, 1549-1560.
- Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop, Jr.T., Khalil, A., 2004. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp. Gerontol.* 39, 59–66.
- She, Z.G., Chen, H.Z., Yan, Y., Li, H., Liu, D.P., 2012. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid. Redox Signal* 16, 597–632.
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., Dekel, N., 2011. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1462–1467.
- Soares, S.R., Troncoso, C., Bosch, E., Serra, V., Simón, C., Remohí, J., Pellicer, A., 2005. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4399–4404.
- Suchocka, Z., Swatowska, J., Pachecka, J., Suchocki, P., 2006. RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 113–119.
- Teiber, J.F., Billecke, S.S., La Du, B.N., Draganov, D.I., 2007. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch. Biochem. Biophys.* 461, 24-29.
- Thomas, N., Goodacre, R., Timmins, E.M., Gaudoin, M., Fleming, R., 2000. Fourier transform infrared spectroscopy of follicular fluids from large and small antral follicles. *Hum. Reprod.* 15, 1667-1671.
- Tikkanen, M.J., Vihma, V., Jauhiainen, M., Höckerstedt, A., Helisten, H., Kaamanen, M., 2002. Lipoprotein-associated estrogens. *Cardiovasc. Res.* 56, 184-188.
- Vihma, V., Adlercreutz, H., Tiitinen, A., Kiuru, P., Wähälä, K., Tikkanen, M.J., 2001. Quantitative determination of estradiol fatty acid esters in human pregnancy serum and ovarian follicular fluid. *Clin. Chem.* 47, 1256-1262.

57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

*Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.*

**Table 1.** Characteristics of the study populations

	Donor	Patient	<i>P</i> value
Age (years), (mean ± SD)	27.9 ± 4.0	38.0 ± 3.8	<i>P</i> <.001
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), (mean ± SD)	23.3 ± 2.6	22.8 ± 1.9	NS
Smoking			
YES (%)	39	26	NS
NO (%)	61	74	NS
Causes of infertility			
Recurrent pregnancy loss (%)		9.8	
Tubal factor (%)		4.9	
Genetic factor (%)		6.9	
Unexplained infertility, low response, age, and iatrogenic failure (%)		78.4	

Note: BMI, body mass index.

**Table 2.** Multiple linear regression analysis of possible determinants for follicular fluid PON3 activity

Independent variables	Standardized coefficients		
	$\beta$	t	P
Constant		10.59	0.000
Group (Donor/Patient)	-0.243	-2.38	0.020
Age (years)	-0.049	-0.302	0.763
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0.037	-0.356	0.999
Number of retrieved oocytes	-0.09	-0.084	0.933
Fertilization rate (%)	-0.012	0.120	0.905

The dependent variable is follicular fluid PON3 activity. The variable Group is coded as 1 (Donor) and 2 (Patient). BMI, body mass index.

**Table 3.** Fertility parameters after an ovulatory stimulation cycle

	Donor	Patient	<i>P</i> value
Mean antral follicle counts (n)	19.4 ± 7.0	14.5 ± 8.4	<i>P</i> <.001
Retrieved oocytes (mean ± SD)	18.0 ± 6.5	11.8 ± 6.7	<i>P</i> <.001
MII oocytes (MII phase), (mean ± SD)	15.1 ± 5.7	9.5 ± 5.2	<i>P</i> <.001
Fertilization rate (%)	77.0 ± 14.7	71.7 ± 23.8	NS
Implantation rate (%)		30.3	
Clinical pregnancy rate (%)		41.5	
Live birth rate (%)		35.5	

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## LEGEND TO THE FIGURES

1  
2 **Fig. 1.** Specificity of anti-PON1, anti-PON2 and anti-PON3 antibodies for PON proteins. Thirty  
3 nanograms of each human recombinant PON1, PON2, and PON3 protein were loaded onto the gel.  
4

5  
6 **Fig. 2.** Box-and-whisker plot, defining intrafollicular A) PON1 arylesterase, B) PON1 paraoxonase,  
7 C) PON2, and D) PON3 activities of large and small follicles from donors and patients. It shows  
8 median, 25th and 75th percentiles, and the extreme values of the distribution. \*\*\* $P < .001$ ; ## $P < 0.01$ .  
9

10  
11 **Fig. 3.** Cumulative distribution of women with respect to the ratio of paraoxonase/arylesterase  
12 activity. PON1 activities were measured in follicular fluid from large follicles. Arrows at ratios of  
13 2.0 and 6.0 are where we divide the phenotypes.  
14

15  
16 **Fig. 4.** Intrafollicular PON1 paraoxonase activity across the PON1 Q192R polymorphism. PON1  
17 activity was determined in follicular fluid of large follicles from the overall cohort. \*\*\* $P < .001$ .  
18

19  
20 **Fig. 5.** Intrafollicular PON1 paraoxonase activity of large follicles in donors and patients according  
21 to PON1 Q192R polymorphism.  
22

23  
24 **Fig. 6.** Protein levels of PON1, PON2, and PON3 in follicular fluid. Representative western blots  
25 for (A) PON1, (B) PON2, and (C) PON3. Each lane corresponds to increasing quantities of the  
26 corresponding human recombinant proteins (STD) and different follicular fluid (FF) samples.  
27 Arrows indicate the position and the calculated apparent molecular weight of the specific PON  
28 protein in follicular fluid. (D) Values correspond to the mean  $\pm$  standard error of the quantified  
29 samples (47, 4, and 31 for PON1, PON2, and PON3, respectively).  
30

31  
32 **Fig. 7.** Protein levels of PON1 and PON3 in serum and follicular fluid. Representative western blots  
33 for (A) PON1 and (B) PON3 in serum (S) and follicular fluid (FF). Different paired samples  
34 (serum and follicular fluid from the same woman) were analyzed on each western blot along with  
35 increasing quantities of the corresponding recombinant proteins (STD). Arrows indicate the position  
36 of the intrafollicular PON proteins. (C) Bars represent the mean + standard error of the quantified  
37 proteins (N=18 paired samples). \*\*\* $P < .001$ .  
38

39  
40 **Fig. 8.** PON activities in serum and follicular fluid. Serum and follicular fluid samples were obtained  
41 from samples of the same woman. \*\*\* $P < .001$ .  
42

43  
44 **Fig. 9.** Correlations between total retrieved oocytes *versus* A) PON1 arylesterase, and B) PON1  
45 paraoxonase in large follicular fluid from the Donor group.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



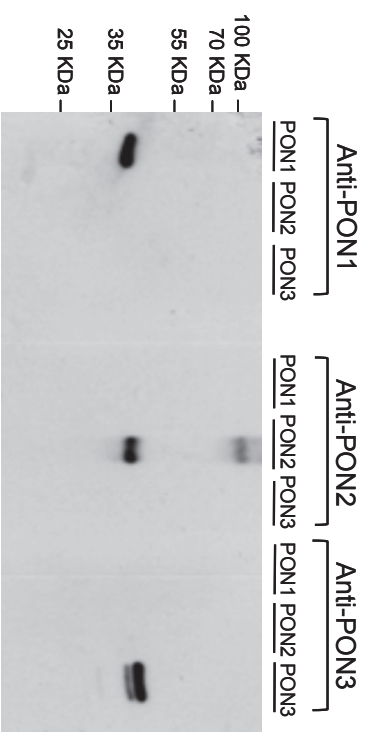
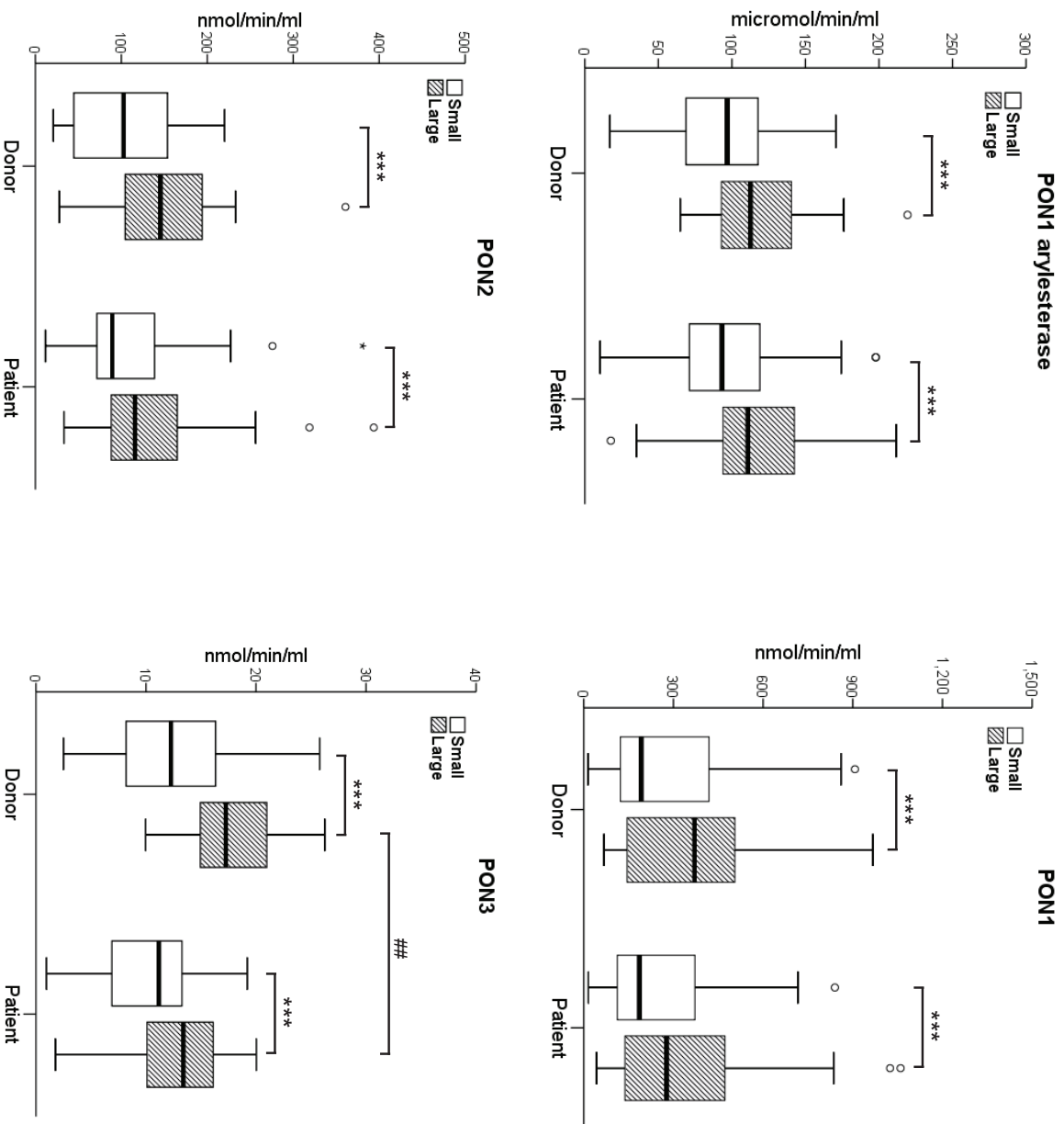
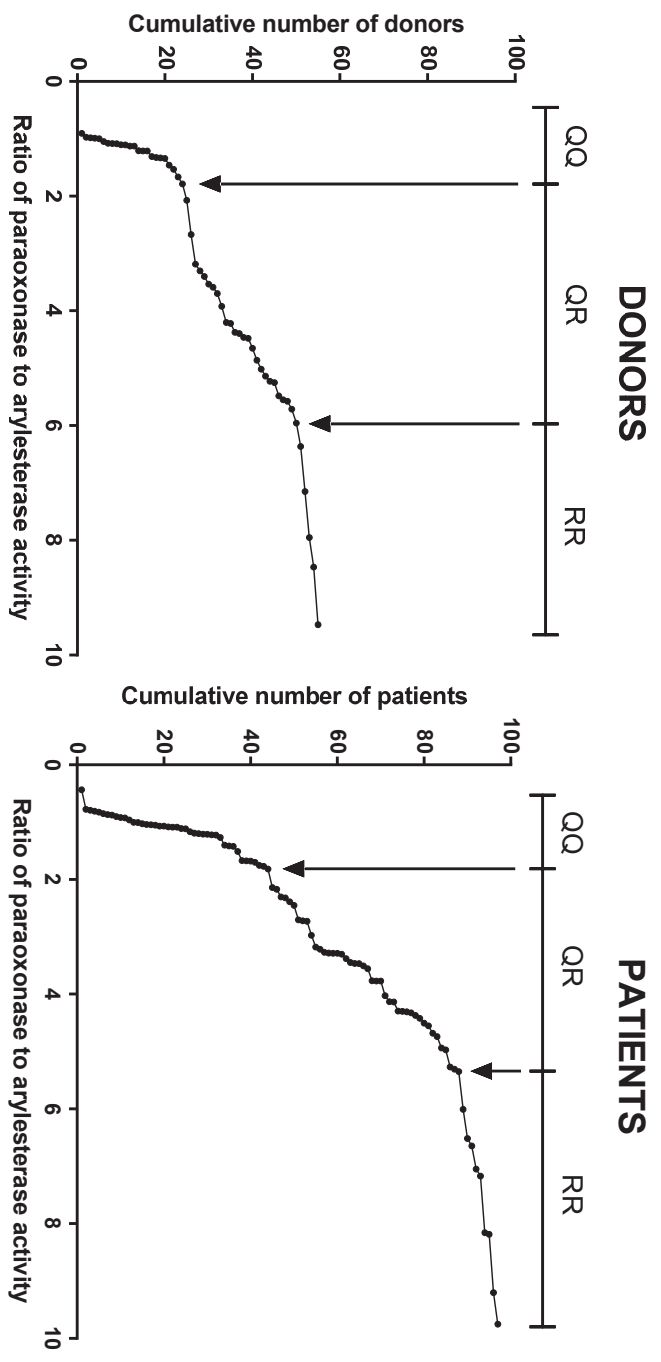
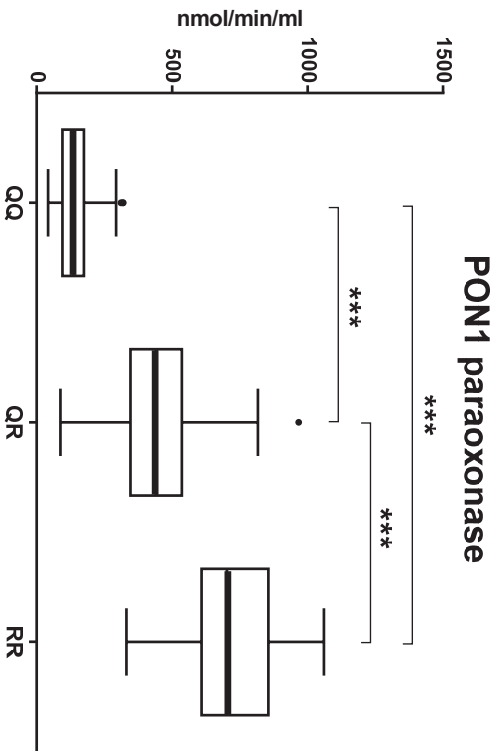


Figure 2







### PON1 paraoxonase

