



## Las concentraciones intrafolliculares de esteroides sexuales y su correlación con las enzimas antioxidantes en la calidad de los ovocitos en un programa de fertilización *in vitro*

Alberto Kably Ambe,\* Julián Ruiz Anguas,\* Esperanza Carballo Mondragón,\* Samuel Karchmer Krivitsky\*

### RESUMEN

**Objetivo:** establecer una correlación entre las concentraciones intrafolliculares de la enzima superóxido dismutasa, de estradiol y su efecto en la calidad y madurez ovocitarias.

**Tipo de estudio:** prospectivo, descriptivo y observacional.

**Pacientes y métodos:** se incluyeron 41 pacientes que ingresaron al programa de fertilización *in vitro* y se les realizó la captura ovular. El protocolo de estimulación ovárica se efectuó con FSH recombinante y antagonistas de GnRH con esquema multidosis. Se aspiró un folículo a la vez, se identificó el líquido folicular de cada ovocito capturado y se almacenó a una temperatura de -20°C. Se obtuvieron 120 líquidos foliculares, en los cuales se realizó determinación de estradiol, de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y se relacionó con calidad ovocitaria, tasa de fertilización y segmentación. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA; la t de Student se utilizó para comparar medias geométricas; la P de Pearson para establecer correlación de variables continuas y la  $\chi^2$  para comparar variables nominales.

**Resultados:** la edad promedio de las pacientes fue de  $33.74 \pm 5.04$  años, el promedio de actividad de la enzima superóxido dismutasa fue de 76.89% y la media geométrica de la concentración enzimática de 68.71 UI/L. No se observaron diferencias significativas al comparar las concentraciones de estradiol o de superóxido dismutasa, ni en su concentración al correlacionarlos por separado en función de la calidad y madurez ovocitarias. Sin embargo, se observó una correlación moderada ( $P= 0.236$ ) entre el porcentaje de inhibición de la enzima superóxido dismutasa y las concentraciones de estradiol intrafollicular, sobre todo en los subgrupos de ovocitos en metafase 2 y posmaduros. Por lo que se refiere a la calidad ovocitaria, se observó una correlación moderada ( $P= 0.218$ ) para los ovocitos de buena calidad al relacionar el porcentaje de la actividad de la superóxido dismutasa con la concentración de estradiol. Se observó una correlación significativa entre la concentración de SOD y la concentración de estradiol en los ovocitos de buena calidad (grado 4).

**Comentarios:** el desarrollo y madurez ovocitarios no sólo dependen de los esteroides sexuales intrafolliculares o de la enzima superóxido dismutasa, sino de la interrelación que existe entre estas variables.

**Palabras clave:** calidad ovocitaria, superóxido dismutasa, estradiol intrafollicular. fertilización *in vitro*.

### ABSTRACT

**Objective:** To establish a correlation between intrafollicular superoxide dismutase enzyme concentrations, activity with oestradiol levels, and the effects on oocyte quality and maturity.

**Study:** Prospective, descriptive and observational.

**Material and methods:** Forty-one patients underwent IVF-ET program. The ovarian stimulation protocol was made with recombinant FSH and GnRH antagonists. All follicles were aspirated one by one, and the follicular fluid was stored at a -20° C room temperature. We retrieved 120 follicular fluids and performed the measurement of oestradiol and superoxide dismutase enzyme on each follicular fluid and its correlation with fertilization and cleavage rates. Statistical analysis was carried out with ANOVA, t Student,  $\chi^2$  and P Pearson tests.

**Results:** Patients' mean age was of  $33.74 \pm 5.04$  years, the mean of enzyme activity was of 76.89%, and the mean concentration of superoxide dismutase enzyme was of 68.71 UI/L. According to oocyte quality or maturity, no statistical differences were observed when comparing oestradiol levels with superoxide dismutase enzyme concentrations. But when we analyzed both variables, we observed a positive correlation in metaphase 2 oocytes ( $p = 0.236$ ). When we correlated the superoxide dismutase enzyme activity with oestradiol concentrations in relation to oocyte quality, a positive correlation in good quality oocytes was observed too ( $p = 0.218$ ). We perceived a strong correlation between SOD concentrations and oestradiol intrafollicular measurements in good quality oocytes.

**Comments:** Oocyte maturity and development are conditioned by a close relationship between SOD and intrafollicular oestradiol.

**Key words:** Oocyte quality, superoxide dismutase, intrafollicular oestradiol, *in vitro* fertilization.



## RÉSUMÉ

**Objectif :** établir une corrélation entre les concentrations intrafolliculaires de l'enzyme superoxyde dimutase, d'œstradiol et son effet sur la qualité et maturité ovocytaires.

**Type d'étude :** prospective, descriptive et observationnelle.

**Matériel et méthodes :** on a inclus 41 patientes qui sont entrées au programme de fertilisation *in vitro* et on leur a réalisé le prélèvement ovulaire. Le protocole de stimulation ovarienne s'est effectué avec FSH recombinante et l'utilisation d'antagonistes de GnRH avec schéma multidose. On a aspiré un follicule à la fois, on a identifié le liquide folliculaire de chaque ovocyte prélevé et on l'a gardé à une température de  $-20^{\circ}$ . On a obtenu 120 liquides folliculaires, dans lesquels on a fait une détermination d'œstradiol, de l'enzyme superoxyde dimutase (SOD) que s'est rattaché avec la qualité ovocytaire, le taux de fertilisation et segmentation. L'analyse statistique s'est effectuée à l'aide du test d'ANOVA ; la t de Student a été utilisé pour comparer moyennes géométriques ; la P de Pearson pour établir corrélation de variables continues et la  $\chi^2$  pour comparer variables nominales.

**Résultats :** l'âge moyen des patientes a été de  $33.74 \pm 5.04$  ans, la moyenne d'activité de l'enzyme superoxyde dimutase a été de 76.89% et la moyenne géométrique de la concentration enzymatique de 68.71 UI/L. On n'a pas observé des différences significatives au moment de comparer les concentrations d'œstradiol ou de superoxyde dimutase, non plus dans leur concentration au moment de les comparer séparément en fonction de la qualité et maturité ovocytaires. Toutefois, on a observé une corrélation modérée ( $P = 0.236$ ) entre le pourcentage d'inhibition de l'enzyme superoxyde dimutase et les concentrations d'œstradiol intrafolliculaire, surtout dans les sous-groupes d'ovocytes en métaphase 2 et post mûrs. En ce qui concerne la qualité ovocytaire, on a observé une corrélation modérée ( $P = 0.218$ ) pour les ovocytes de bonne qualité au moment de rattacher le pourcentage de l'activité de la superoxyde dimutase à la concentration d'œstradiol. On a observé une corrélation significative entre la concentration de SOD et la concentration d'œstradiol dans les ovocytes de bonne qualité (degré 4).

**Commentaires :** le développement et maturité ovocytaires ne dépendent pas seulement des stéroïdes sexuels intrafolliculaires ou de l'enzyme superoxyde dimutase, mais de l'interrelation qui existe entre ces variables.

**Mots-clé :** qualité ovocytaire, superoxyde dimutase, œstradiol intrafolliculaire, fertilisation *in vitro*.

## RESUMO

**Objetivo:** estabelecer uma correlação entre as concentrações intra-foliculares da enzima superóxido dismutasa, de estradiol e seu efeito na qualidade e maturidade oocitárias.

**Tipo de estudo:** prospectivo, descritivo e observacional.

**Material e métodos:** incluíram-se 41 pacientes que ingressaram ao programa de fertilização *in vitro* e foi praticada a captura ovular nelas. O protocolo de estimulação ovárica efetuou-se com FSH recombinante e o uso de antagonistas de GnRH com esquema multidose. Aspirou-se um foliculo de cada vez, se identificou o líquido folicular de cada oócito capturado e se conservou à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Obtiveram-se 120 líquidos foliculares, nos quais se efetuou a determinação de estradiol, da enzima superóxido dismutasa (SOD) e se relacionou com qualidade oocitária, taxa de fertilização e segmentação. A análise estatística se efetuou mediante a prova de ANOVA; o t de Student se utilizou para comparar médias geométricas; o P de Pearson para estabelecer correlação de variáveis contínuas e a  $\chi^2$  para comparar variáveis nominais.

**Resultados:** a idade média das pacientes foi de  $33,74 \pm 5,04$  anos, a média de atividade da enzima superóxido dismutasa foi de 76,89% e a média geométrica da concentração enzimática de 68,71 UI/L. Não se observaram diferenças significativas ao comparar as concentrações de estradiol ou de superóxido dismutasa, nem na sua concentração ao serem correlacionados isoladamente em função da qualidade e maturidade oocitárias. Observou-se, porém, uma moderada correlação entre a porcentagem de inibição da enzima superóxido dismutasa e as concentrações de estradiol intra-folicular, sobretudo nos subgrupos de oócitos em metafase 2 e pós-maduros. Pelo que refere-se à qualidade oocitária, se observou uma correlação moderada ( $P = 0,218$ ) para os oócitos de boa qualidade ao relacionar a porcentagem da atividade da superóxido dismutasa com a concentração de estradiol. Observou-se uma correlação significativa entre a concentração de SOD e a concentração de estradiol nos oócitos de boa qualidade (grau 4).

**Comentários:** o desenvolvimento e maturidade oocitárias não dependem só dos esteróides sexuais intra-foliculares ou da enzima superóxido dismutasa, mas da inter-relação que existe entre estas variáveis.

**Palavras chave:** qualidade oocitária, superóxido dismutasa, estradiol intra-folicular, fertilização *in vitro*.

\* Unidad de reproducción asistida, Centro Especializado para la Atención de la Mujer, Hospital Ángeles de las Lomas.

Correspondencia: Dr. Alberto Kably Ambe. Unidad de reproducción asistida, Centro Especializado para la Atención de la Mujer, Hospital Ángeles de las Lomas. Vialidad de la Barranca s/n-240,

colonia Valle de las Palmas, Estado de México, CP 52763. E-mail: cepam@infosel.net.mx

Recibido: noviembre, 2004. Aceptado: noviembre, 2004.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)

**E**l episodio más importante durante los esquemas de estimulación ovárica es el crecimiento y maduración folicular, cuyo desarrollo debe monitorizarse adecuadamente a través de ultrasonidos y concentraciones séricas de estradiol.

Alrededor del día de la ovulación existe una importante actividad angiogénica. Las células germinales endoteliales crecen a partir de los capilares y vénulas de la teca, pasan a través de la lámina propia hacia la granulosa y establecen un sistema vascular con un flujo sanguíneo importante.<sup>1</sup>

El líquido folicular constituye el microambiente por el cual se nutre el ovocito y está formado, principalmente, por un exudado plasmático de las células foliculares. Durante el desarrollo y maduración foliculares aumenta el volumen del líquido folicular y en las concentraciones de estradiol, decisivas para la madurez óptima del ovocito. Algunos autores postulan que las concentraciones de estradiol, progesterona y prolactina intrafoliculares pueden ser marcadores potenciales de la calidad ovocitaria.<sup>2,3,4</sup>

Está demostrado que las concentraciones de estradiol y progesterona séricas se correlacionan con sus concentraciones en el líquido folicular; sin embargo, no se ha visto que esta relación varíe significativamente durante el desarrollo folicular entre los ciclos con y sin estimulación.

En un estudio realizado por nuestro grupo se observó que existe una correlación importante entre las concentraciones séricas e intrafoliculares de estradiol. Asimismo, la concentración intrafolicular de esteroides sexuales, específicamente la testosterona en concentraciones inferiores a los 1400 ng/mL, se relaciona con ovocitos maduros. El índice de estradiol/progesterona intrafolicular menor a 100 se relaciona con óvulos fertilizados.<sup>5</sup>

Se reporta que, dentro del microambiente folicular, los radicales libres de oxígeno interfieren con el desarrollo y calidad ovocitarios, por lo que el equilibrio oxidante-antioxidante en el ovario desempeña un papel fundamental en la foliculogénesis y la capacidad de fertilización del ovocito y del espermatozoide.<sup>6</sup>

Dentro de las principales enzimas antioxidantes, se encuentra la familia de la superóxido dismutasa (SOD) que son metaloenzimas esenciales para el sistema de

defensa antioxidante contra aniones superóxido implicados en varios procesos fisiopatológicos, incluyendo la inflamación e isquemia.<sup>6</sup>

En los tejidos de los mamíferos existen tres isoformas de la superóxido dismutasa: dependiente de cobre y zinc (Cu-Zn SOD), dependiente de manganeso (Mn-SOD) y extracelular (e-SOD).<sup>7</sup>

Los tres subtipos se encuentran en el ovario y su patrón de expresión se relaciona directamente con las gonadotropinas. Autores como Susuki<sup>8</sup> o Tomate<sup>9</sup> sugieren que estas enzimas desempeñan un papel importante en el proceso de regresión lútea e inhiben el fenómeno de apoptosis en el foliculo.

Se dice que la actividad de la superóxido dismutasa en las células de la granulosa es dependiente de la progesterona y que, a su vez, asume un papel importante en la biosíntesis de esteroides<sup>10</sup> en las células de la teca interna.

Cabe señalar que el desarrollo folicular y, por ende, la madurez ovocitaria están determinados por una estrecha relación entre las concentraciones hormonales intrafoliculares que nutren al ovocito y que interactúan a la par con sustancias y hormonas antioxidantes (superóxido dismutasa), las cuales inactivan a los radicales libres de oxígeno y protegen contra su efecto deletéreo del ovocito en desarrollo.

Con base en los estudios anteriores y con el objetivo de establecer una correlación entre las concentraciones intrafoliculares de la enzima superóxido dismutasa y las de estradiol, así como su efecto en la calidad y madurez ovocitarias, se decidió realizar un estudio prospectivo y descriptivo en pacientes a las que se les efectuó fertilización *in vitro* y transferencia embrionaria (FIVTE).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se elaboró un estudio prospectivo y observacional entre mayo del 2003 y abril del 2004, en la unidad de reproducción asistida del Centro Especializado para la Atención de la Mujer del Hospital Ángeles de las Lomas, en el que se incluyeron 41 pacientes que ingresaron al programa de FIVTE y a las cuales se les realizó captura ovular.

El protocolo de estimulación de las pacientes se realizó con FSH recombinante, (Gonal F® Serono). Se

utilizó el esquema multidosis de antagonistas de GnRH Cetrotide (Cetrotide® Serono).<sup>11</sup>

El monitoreo de la estimulación ovárica se realizó mediante ultrasonido endovaginal y determinaciones de estradiol y LH. Se aplicó hCG recombinante a razón de 250 mcg (Ovidrel® Serono) para inducir la maduración final ovocitaria. Al observar por lo menos tres folículos mayores de 18 milímetros, se programó la captura ovular (después de 36 horas); ésta se realizó bajo sedación intravenosa. Se procedió a aspirar un folículo a la vez, con el fin de identificar el líquido folicular de cada ovocito capturado.

El líquido folicular obtenido se almacenó a una temperatura de -20°C para su posterior evaluación.

Los ovocitos capturados se valoraron en función de su estadio de maduración: profase, metafase 1 y metafase 2. Por lo que se refiere a su calidad, se utilizó la clasificación basada en el cuerpo polar, espacio perivitelino e inclusiones citoplasmáticas.<sup>12</sup> Se determinaron cuatro categorías: grado cuatro, óvulos con cuerpo polar y espacio perivitelino normales; grado tres, cuerpo polar fragmentado con espacio perivitelino normal; grado dos, cuerpo polar normal y espacio perivitelino alargado; grado uno, óvulos con alteraciones en el espacio perivitelino y en el cuerpo polar.

Los ovocitos se incubaron individualmente en medio P1 (Irving Scientific), adicionado con 10% de SSS (Synthetical Serum Substitute® Irving Scientific) durante cuatro a seis horas, según el estadio de maduración.

Enseguida se efectuó la inseminación con una concentración de 250,000 espermatozoides por mL, los cuales se mantuvieron en incubación a 37°C, con una concentración del 5% de CO<sub>2</sub> y humedad del 99% durante 15 y 17 horas. La verificación de la fertilización se realizó 17 horas después de la inseminación y se determinó la presencia de dos pronúcleos.

Para la determinación de la concentración y porcentaje de la actividad de la enzima superóxido dismutasa se analizaron los líquidos foliculares de cada ovocito transferido, mediante un ensayo enzimático y espectrofotómetro con SOD Assay Kit® WST Lab.; mientras que las concentraciones de estradiol intrafolicular se determinaron mediante radioinmunoensayo.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA; la prueba de la de la t de Student se utilizó para comparar medias y medias geométricas de las variables; la p de Pearson para establecer correlación entre variables continuas y la  $\chi^2$  para comparar variables nominales. Asimismo, se utilizó el programa estadístico SPSS Windows® (Microsoft Co).

## RESULTADOS

La edad promedio de las pacientes fue de  $33.74 \pm 5.04$  años. Se obtuvieron 120 líquidos foliculares, a los que se les realizó determinación de la concentración de la superóxido dismutasa, así como de su porcentaje de actividad.

El promedio de actividad de la superóxido dismutasa fue del 76.89%, mientras que la media geométrica de la concentración enzimática folicular fue de 68.71 UI/L con un rango entre 6.04 y 99.48 UI/L.

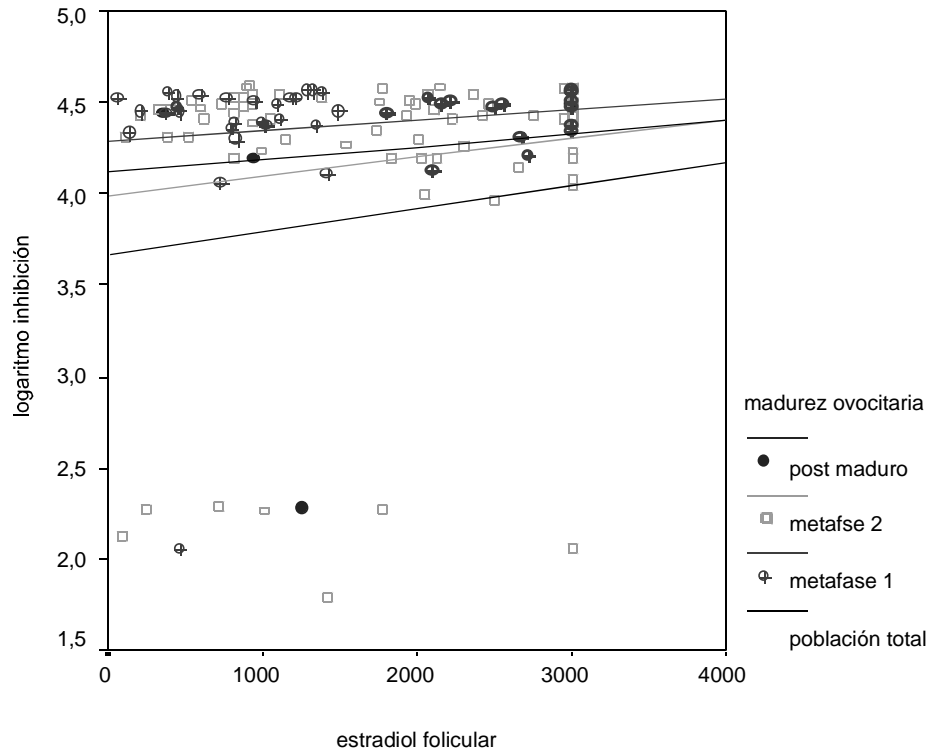
Con el fin de realizar el análisis estadístico y observar una distribución normal de los valores del porcentaje de inhibición y de la concentración de la superóxido dismutasa, se decidió convertir dicho análisis en logaritmo natural de sus valores originales y se denominó promedio geométrico.

Los valores de estradiol intrafolicular se transformaron de picogramos/mL a nanogramos/mL, debido a que las concentraciones eran muy altas y era más adecuado para fines estadísticos.

Al correlacionar las concentraciones del promedio geométrico del porcentaje de inhibición y de las concentraciones de estradiol intrafolicular, se observó una correlación moderada  $p = 0.236$  (figura 1). Para los subgrupos de ovocitos en metafase 2 y posmaduros, la correlación fue más estrecha.

De acuerdo con la madurez ovocitaria, no se apreció correlación entre ambas variables (figura 2) al asociar las concentraciones de estradiol intrafolicular y el promedio geométrico de la concentración de la superóxido dismutasa.

Con respecto a la calidad ovocitaria, al relacionar el promedio geométrico del porcentaje de la actividad de la superóxido dismutasa intrafolicular con la concentración de estradiol se observó una correlación moderada ( $p = 218$ ), en especial para los ovocitos con calidad 3 y 4 (figura 3).



**Figura 1.** Correlación del porcentaje de inhibición y concentración de estradiol de acuerdo con la madurez ovocitaria.

Al asociar el promedio geométrico de la concentración de la superóxido dismutasa con la concentración de estradiol en función de la calidad ovocitaria, se observó que sólo existía correlación estadísticamente significativa con los ovocitos de buena calidad (grado 4), (figura 4).

En relación con el grado de madurez ovocitaria, al comparar las concentraciones de estradiol intrafolicular se observó que los ovocitos en metafase 2 tenían mayor concentración de estradiol intrafolicular (1726.40 ng/mL) que los ovocitos en metafase 1 y posmaduros (1428.70 ng/mL y 1397.30), sin una diferencia estadísticamente significativa (figura 5).

Al correlacionar las concentraciones de estradiol intrafolicular con la calidad ovocitaria, se encontró que los ovocitos de mejor calidad (grado 4 y grado 3) tenían concentraciones de estradiol intrafolicular más bajas que los ovocitos de mala calidad; 956.2 ng/mL y 1346.80 ng/mL vs 1660.45 ng/mL y 1914.80 ng/mL, pero sin diferencia estadística (figura 6).

Al comparar el porcentaje de inhibición de la enzima superóxido dismutasa en relación con la

madurez ovocitaria, se observó un porcentaje de actividad muy similar en los grupos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (figura 7).

No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos (figura 8), al comparar el promedio geométrico del porcentaje de inhibición con la calidad ovocitaria.

## COMENTARIOS

En el estudio aquí reportado se observó y confirmó que el microambiente folicular constituido por un medio rico en esteroides sexuales interviene en el desarrollo y calidad de los ovocitos, durante los ciclos de hiperestimulación ovárica controlada en programas de fertilización *in vitro*. Estos datos coinciden con reportes bibliográficos previos.<sup>2,3,5</sup>

Se observaron datos interesantes y a la vez controvertidos en relación con lo reportado en la bibliografía, al analizar por separado las variables de estradiol intrafolicular y el porcentaje de actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa.

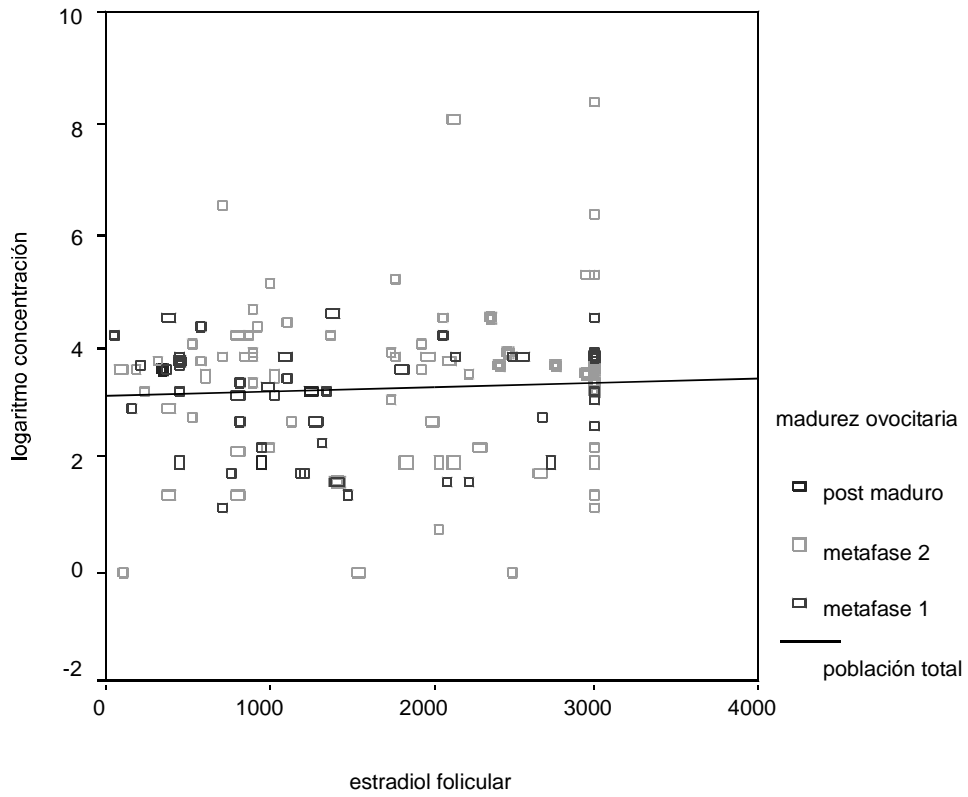


Figura 2. Correlación de las concentraciones de estradiol y la concentración de la superóxido dismutasa.

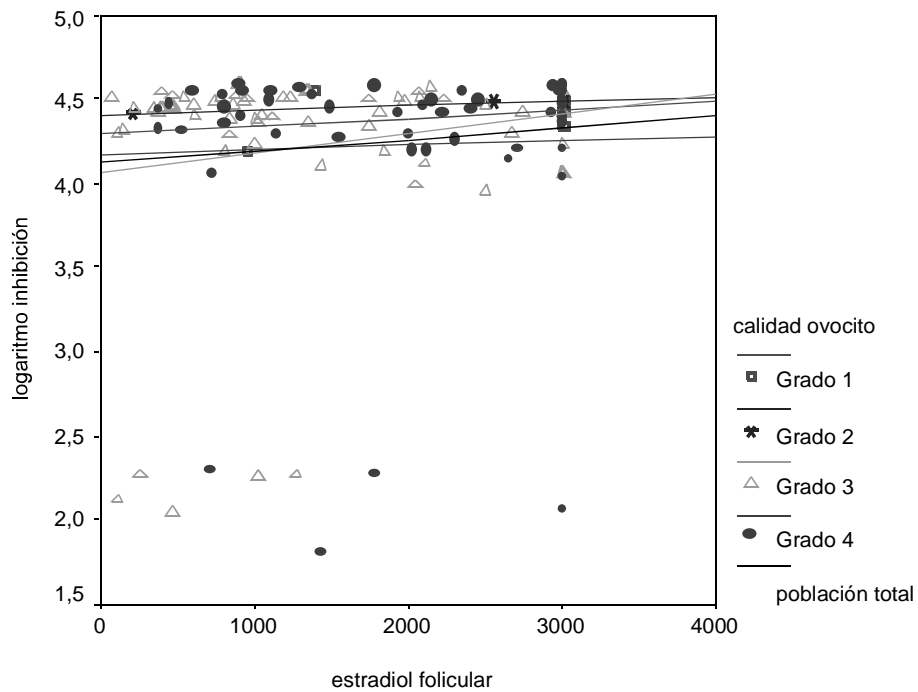
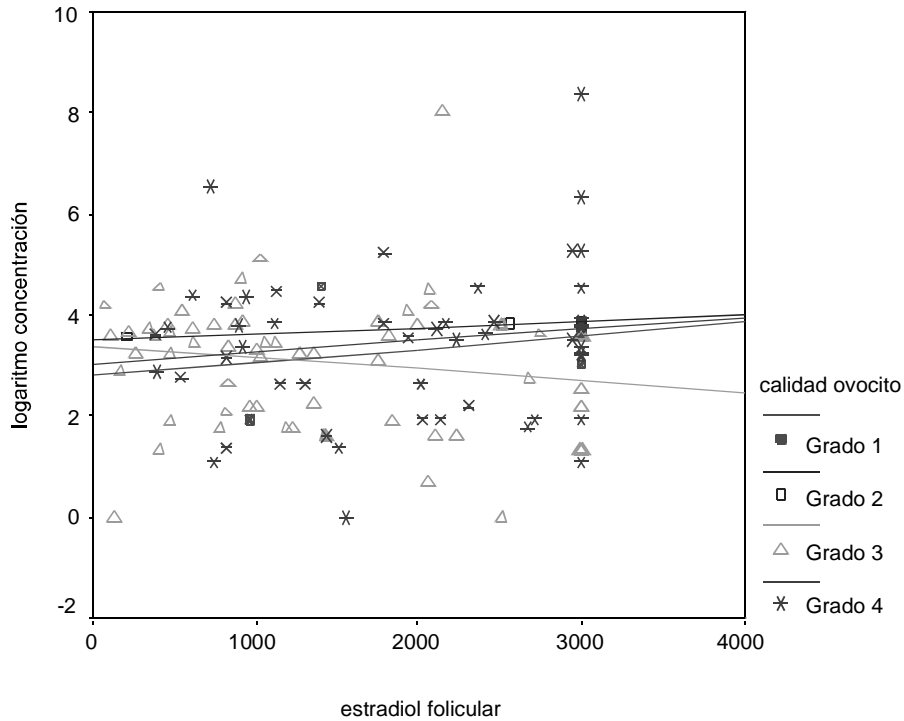
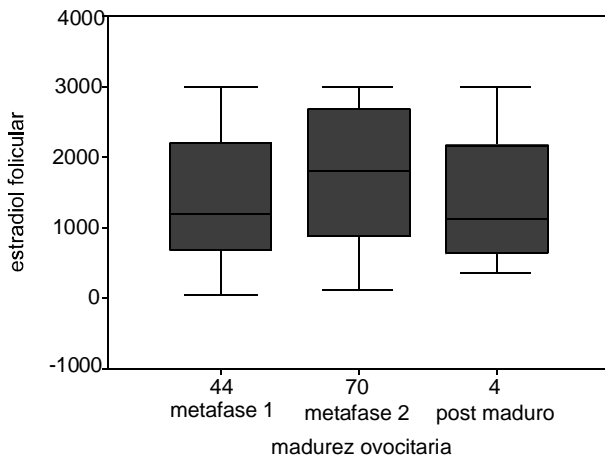


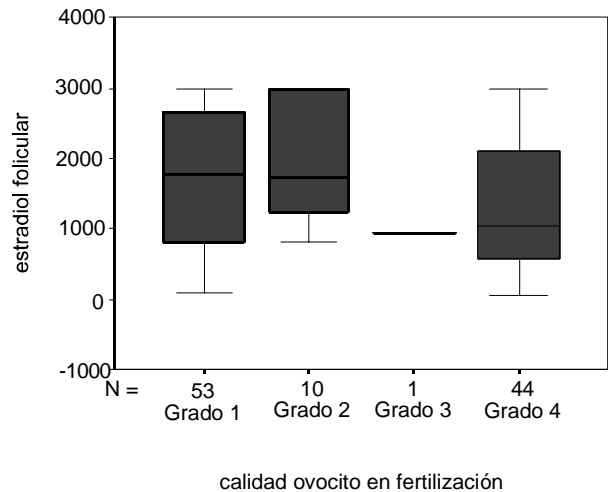
Figura 3. Correlación de la superóxido dismutasa y las concentraciones de estradiol de acuerdo con la calidad ovocitaria.



**Figura 4.** Correlación de la concentración de la superóxido dismutasa y el estradiol en relación con la calidad ovocitaria.



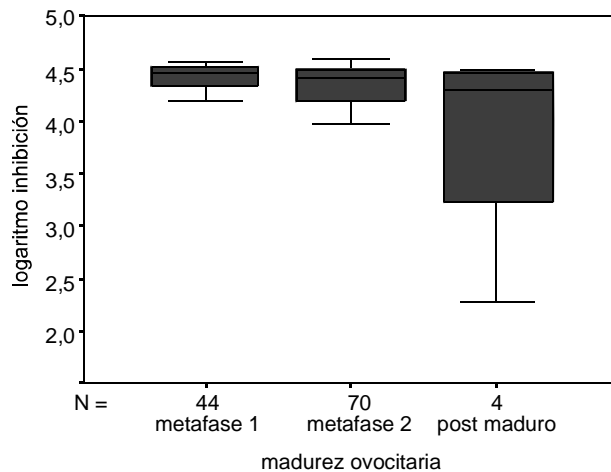
**Figura 5.** Concentraciones de estradiol de acuerdo con la madurez ovular.



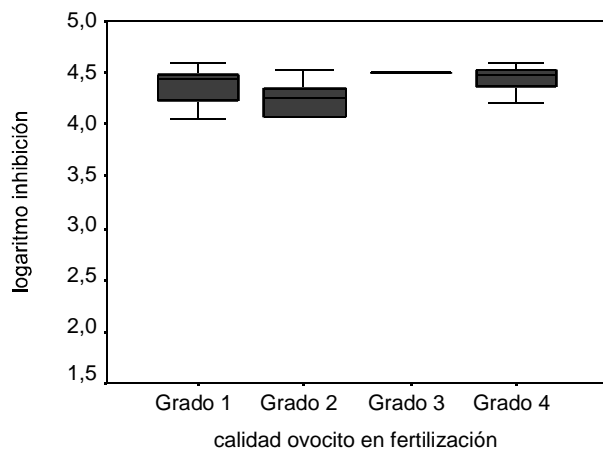
**Figura 6.** Concentraciones de estradiol folicular de acuerdo con la calidad ovocitaria.

No se observó una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de estradiol intrafolicular y la calidad o madurez ovocitarias; más bien se apreció cierta tendencia a que los ovocitos con mayor calidad (Grado 3 y 4) o en metafase 2 tuvieran concentraciones discretamente

mayores de estradiol, en relación con su contraparte (ovocitos de mala calidad e inmaduros). Estos datos difieren de los reportados por Botero y Ruiz, quienes señalaron que a mayores concentraciones de estradiol intrafolicular mejor calidad y madurez ovocitarias.



**Figura 7.** Porcentaje de inhibición de la superóxido dismutasa en función de la madurez ovocitaria.



**Figura 8.** Porcentaje de inhibición de la superóxido dismutasa en relación con la calidad ovular.

Al analizar el porcentaje de actividad de la enzima superóxido dismutasa, no se demostró una correlación estadística entre la calidad ovocitaria y su madurez que representa la capacidad antioxidante e inactivación de los radicales libres de oxígeno, puesto que los porcentajes de la actividad de la enzima fueron muy similares al compararlos con la calidad ovocitaria y su madurez, contrario a lo que autores como Tamate<sup>9</sup> reportaron: a mayor actividad de enzimas antioxidantes (SOD) mejor calidad ovocitaria.

Sin embargo, son pocos los estudios que han descrito la interacción que existe entre las concentraciones de estradiol intrafolicular y las de la enzima

superóxido dismutasa o su porcentaje de actividad. No se observaron correlaciones estadísticamente significativas al analizar las variables por separado, como se mencionó en los párrafos previos. No obstante, al evaluar los resultados se encontró una correlación lineal entre las concentraciones de estradiol intrafolicular y el porcentaje de actividad de la enzima superóxido dismutasa, el cual fue estadísticamente significativo. Lo anterior indica que existe una interacción estrecha entre la producción de esteroides intrafoliculares y el equilibrio oxidante-antioxidante del foliculo, el cual está condicionado principalmente por la enzima antioxidante. Se apreció que esta asociación tuvo mayor significado estadístico en ovocitos que se encontraban en metafase 2 y en los de buena calidad (grupo 3), que en los ovocitos en metafase 1 y posmaduros. Por los motivos aquí expuestos y con base en los resultados encontrados, puede postularse que el desarrollo y madurez ovocitarios durante ciclos estimulados con esquemas específicos para fertilización *in vitro* no dependen exclusivamente de la concentración de esteroides séricos o intrafoliculares, puesto que el equilibrio antioxidante y la homeostasia existentes en los radicales libres de oxígeno del foliculo también interfieren y, a su vez, pueden verse influidos por una serie de variables (edad de la paciente y protocolo de estimulación).

#### REFERENCIAS

1. McClure NM, Mac Pherson AM, Abberton KM, Healy DL, Rogers PAW. Human follicular fluid and endothelial cells. *Hum Reprod* 1993;8:1564-69.
2. Tralatzis BC, Pazaitou K, Bantis J, et al. Growth hormone, estradiol, progesterona and testosterona concentrations in follicular fluid alter ovarian stimulation with various regimens for assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993;16:12-16.
3. Fishel SB, Edwards RG, Walters DE. Follicular steroids as prognosticators of succesful fertilization of human oocytes in vitro. *J Endocrinol* 1983;99:335-9.
4. Botero-Ruiz W, Laufer N, De Cherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocyte in vitro. *Fertil Steril* 1984;41:820-6.
5. Kably AA, Ruiz AJ, Carballo ME, Garzón NJA, Karchmer KS. Evaluación de la proporción de esteroides sexuales intrafoliculares y séricos con el grado de madurez ovular. *Acta Med Gpo Ang* 2003;1:11-16.
6. Dinara S, Sengoku K, Tamate K, Harikana M, Ishikawa M. Effects of supplementation with free radical scavengers on



- the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod* 2000;16:1976-81.
7. Surgino N, Takaguchi S, Kashida S, Karub A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000;6:19-25.
  8. Susuki T, Surgiyama S, Uda T, Takay R, Yajima A. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries. *Fertil Steril* 1999;72:720-26.
  9. Tamate K, Sengolu K, Ishikawa M. The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1995;21:401-9.
  10. Sabati L, Wilson C, Lower A, Alk Shawaf T, Grudzinski G. Superoxide dismutase activity on human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999;72:1027-39.
  11. Kably AA, Ruiz AJ, Baptista A, Serulle TY, Quesnel GBC. Uso de antagonistas de GnRH (Cetrorelix) en reproducción asistida: primer informe en la literatura mexicana. *Ginecol Obstet Mex* 2002;70:424-29.
  12. De Vries J. Section 5. The oocyte/practice. In: Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Veneld M. *IVF Lab. Laboratory aspects of in vitro fertilization*. Amsterdam: Organon 1996;pp:95-110.