



# GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

Volumen 76, número 1, enero 2008

## CONTENIDO

## CONTENT

### EDITORIAL

- 1 Carlos Fernández del Castillo S

### ARTÍCULOS ORIGINALES

- 3 **Cambios en la concentración de la interleucina 6 en exudados cervicovaginales en trabajo de parto**  
*Aurora Espejel Núñez, Myrna Godines Enríquez, Gerardo Buendía Díaz, Eduardo Guzmán González, Jorge Beltrán Montoya, Felipe Vadillo Ortega*
- 9 **Prevalencia y factores asociados con infección por virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide**  
*Wendoline Rojo Contreras, Héctor Montoya Fuentes, Jorge I Gámez Nava, Ángel E Suárez Rincón, Jesús Vázquez Salcedo, Miguel Padilla Rosas, Luz M Baltazar Rodríguez, Xochitl Trujillo, Mario Ramírez Flores, Benjamín Trujillo Hernández, Laura González López*
- 18 **Inseminación intrauterina versus coito programado en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada**  
*Juan Carlos Barros Delgadillo, Evaristo Martínez Barrios, Christian Moreno Aburto, Mirna Souraye Godines Enríquez, Félix Manzur Navarrete, Víctor Sánchez Solís, Gerardo Barroso Villa*
- 32 **Identificación del perfil de metaloproteasas de matriz extracelular en membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino mediante microarreglos solubles**  
*Nardhy Gómez López, Guadalupe Estrada Gutiérrez, Jorge Beltrán Montoya, Aurora Espejel Núñez, Felipe Vadillo Ortega*
- 38 **Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación**  
*Rodrigo Vega Sánchez, Marisol Castillo Castrejón, Yolanda Horne-las Orozco, Nardhy Gómez López, Jorge Beltrán Montoya, Felipe Vadillo Ortega*
- 45 **Evidencia de que las subpoblaciones de leucocitos periplacentarios al término de la gestación poseen propiedades funcionales relacionadas con la inducción del trabajo de parto**  
*Arturo Flores Pliego, Jorge Beltrán Montoya, Nardhy Gómez López, Felipe Vadillo Ortega*

### ARTÍCULO DE REVISIÓN

- 52 **Descripción de los elementos biológicos implicados en el inicio de un nuevo organismo. Revisión de investigaciones contemporáneas sobre el desarrollo embrionario temprano**  
*Alejandra Huerta Zepeda, María Elena Torres Padilla, Rodrigo Guerra López*

### CARTA AL EDITOR

- 65 José Curiel Valdés

### HACE 55 AÑOS

- 67 **Peristaltismo de la trompa de Falopio**  
*Alfonso Álvarez Bravo*

### EDITORIAL

- 1 Carlos Fernández del Castillo S

### ORIGINAL ARTICLES

- 3 **Interleukin-6 levels changes in cervicovaginal exudates in labor evolution**  
*Aurora Espejel Núñez, Myrna Godines Enríquez, Gerardo Buendía Díaz, Eduardo Guzmán González, Jorge Beltrán Montoya, Felipe Vadillo Ortega*
- 9 **Prevalence and cervical human papilloma virus associated factors in patients with rheumatoid arthritis**  
*Wendoline Rojo Contreras, Héctor Montoya Fuentes, Jorge I Gámez Nava, Ángel E Suárez Rincón, Jesús Vázquez Salcedo, Miguel Padilla Rosas, Luz M Baltazar Rodríguez, Xochitl Trujillo, Mario Ramírez Flores, Benjamín Trujillo Hernández, Laura González López*
- 18 **Intrauterine insemination versus programmed intercourse in cycles of controlled ovarian hyperstimulation**  
*Juan Carlos Barros Delgadillo, Evaristo Martínez Barrios, Christian Moreno Aburto, Mirna Souraye Godines Enríquez, Félix Manzur Navarrete, Víctor Sánchez Solís, Gerardo Barroso Villa*
- 32 **Extracellular matrix metalloproteases profile identification in chorioamniotic membranes of term and preterm pregnancies through soluble microarrays**  
*Nardhy Gómez López, Guadalupe Estrada Gutiérrez, Jorge Beltrán Montoya, Aurora Espejel Núñez, Felipe Vadillo Ortega*
- 38 **Three-dimensional analysis of human chorioamniotic membranes structure in term pregnancy**  
*Rodrigo Vega Sánchez, Marisol Castillo Castrejón, Yolanda Horne-las Orozco, Nardhy Gómez López, Jorge Beltrán Montoya, Felipe Vadillo Ortega*
- 45 **Evidence that periplacentary leukocytes subpopulations of term pregnancy have functional properties associated with labor induction**  
*Arturo Flores Pliego, Jorge Beltrán Montoya, Nardhy Gómez López, Felipe Vadillo Ortega*

### REVIEW ARTICLE

- 52 **Description of biological elements involved in new organism beginning. Review of contemporary investigations about early embryony development**  
*Alejandra Huerta Zepeda, María Elena Torres Padilla, Rodrigo Guerra López*

### LETTER TO THE EDITOR

- 65 José Curiel Valdés

### 55 YEARS AGO

- 67 **Fallopian tube peristaltism**  
*Alfonso Álvarez Bravo*

La Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia premia, cada año, en el Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, los mejores trabajos de las áreas de investigación básica y clínica, mismos que ahora se publican en esta edición de nuestra revista GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO. Reconforta saber que cada vez es mayor el número de investigaciones que se envían para participar en los premios del congreso y que su calidad se va, también, refinando.

El primer lugar de la categoría de investigación clínica se otorgó al trabajo: "Cambios en la concentración de la interleucina 6 en exudados cervicovaginales en trabajo de parto". Debido a la estrecha relación clínica de la infección intrauterina con el inicio del parto pretérmino, la interleucina 6 (IL-6) es una de las citocinas más estudiadas en relación con el trabajo de parto pretérmino, porque se trata de una molécula amplificadora de la respuesta inflamatoria directamente vinculada con las infecciones del aparato reproductor que se adquieren durante el embarazo. Sin duda que a los ginecólogos y obstetras habrá de resultarles interesante la lectura de este trabajo por sus posibilidades de enriquecer el conocimiento.

El segundo lugar se otorgó a la investigación: "Prevalencia y factores asociados con infección por virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide". Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la prevalencia de infección por virus del papiloma humano mediante pruebas de biología molecular y analizar los factores concomitantes con esta infección en pacientes con artritis reumatoide. Los resultados y las conclusiones de esta investigación aportan información relevante para el mejor desempeño de la clínica diaria.

El tercer lugar correspondió al trabajo: "Inseminación intrauterina *versus* coito programado en ciclos

de hiperestimulación ovárica controlada." Se trata de un estudio analítico, comparativo, retrospectivo y longitudinal de casos y controles de parejas en donde se demuestra, entre otras variantes, que la edad de la mujer se relaciona de manera directa con la fecundidad, misma que disminuye con el paso de los años. Siempre existen opciones para cada caso de parejas con dificultades para lograr un embarazo a término y la que aquí se expone es una de ellas.

Los trabajos premiados de la categoría de investigación básica son igualmente relevantes y motivo de reconocimiento por el esfuerzo que significa hacer este tipo de investigación, no por limitación de recursos humanos sino, sobre todo, de recursos económicos. Ambos tipos de investigación deberán estimularse siempre porque los dos contribuyen a ampliar el conocimiento y a mejorar la salud de nuestras pacientes.

Hace 55 años, el maestro Alfonso Álvarez Bravo publicó un interesante trabajo sobre el peristaltismo de la trompa de Falopio del que resaltó que: "...obtener oscilaciones manométricas en estos casos en que no existía la porción intersticial de las trompas y en las que quedó conservada la musculatura del cuerno uterino, ha llevado a este autor a la conclusión de que las fluctuaciones de la curva quimográfica normal son debidas a la acción de la musculatura del cuerno uterino, es decir, a la actividad de la porción uterina del "complejo cornual".

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO ampliará el número de dictaminadores, incrementará la cantidad de artículos de nivel de evidencia II y II-1 para poder incorporar la revista a índices de más alto impacto y mejor reconocimiento para los autores. Esto beneficiará la educación médica continuada de los lectores.

**Dr. Carlos Fernández del Castillo S**

## Cambios en la concentración de la interleucina 6 en exudados cervicovaginales en trabajo de parto\*

Aurora Espejel Núñez,\* Myrna Godines Enríquez,\*\* Gerardo Buendía Díaz,\*\*\* Eduardo Guzmán González,\*\*\* Jorge Beltrán Montoya,\*\* Felipe Vadillo Ortega\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la secreción de interleucina 6 (IL-6) en exudado cervicovaginal en una pseudocohorte que emula la evolución del trabajo de parto.

**Material y método:** se tomaron muestras de exudado cervicovaginal de pacientes con 20 a 40 semanas de gestación que se clasificaron en cinco estratos de evolución del trabajo de parto. Cada estrato refleja la activación progresiva de la actividad uterina y los cambios cervicales. A cada muestra se le determinó la IL-6 mediante el sistema Multiplex. Se eliminaron las muestras de las pacientes con datos de infección.

**Resultados:** se incluyeron 173 muestras repartidas en cada uno de los cinco estratos. A lo largo de la gestación existe secreción basal de IL-6 al exudado cervicovaginal que no se modifica hasta que aparece el trabajo de parto activo. Sólo cuando la actividad uterina se manifiesta en forma regular y efectiva, se demuestra aumento muy significativo en la concentración de IL-6 en el exudado.

**Conclusiones:** la IL-6 es una citocina proinflamatoria que aumenta de manera específica cuando se inicia la actividad uterina efectiva; por ello es un elemento susceptible de ser evaluado como marcador pronóstico del trabajo de parto normal y pretérmino.

**Palabras clave:** interleucina 6, trabajo de parto.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the secretion of interleukin 6 (IL-6) in cervicovaginal fluid in a pseudocohort that emulates the evolution of the labor.

**Material and method:** Samples of cervicovaginal fluid of patients with 20 to 40 weeks of gestation were taken, patients were classified in 5 strata of the development of the labor. Each stratum reflects the progressive activation of the uterine activity and the cervical changes. To each sample was made determination of IL-6 by means of the system Multiplex. The samples of patient with infection data were eliminated.

**Results:** 173 samples were included distributed in each one of the five strata. Basal secretion exists of IL-6 to the cervicovaginal fluid along the gestation, that doesn't modify until the active labor appears. Only when the uterine activity is manifested in form to regulate and effective, very significant increase is documented in the concentration of the IL-6 in the cervicovaginal fluid.

**Conclusions:** The IL-6 it is a proinflammatory cytokine that increases in a specific way in the moment in that the effective uterine activity begins, thus, it is an excellent candidate to be evaluated as marker presage of the event of normal labor and preterm.

**Key words:** interleukin 6, labor.

### RÉSUMÉ

**Objectif :** évaluer la sécrétion de l'IL-6 en exsudat cervico-vaginal dans une pseudo-cohorte qui émule l'évolution du travail.

**Matériel et méthode :** on a pris des échantillons d'exsudat cervico-vaginal de patientes avec 20 à 40 semaines de gestation qui se sont classées en cinq strates d'évolution du travail. Chaque strate reflète l'activation progressive de l'activité utérine et les changements cervicaux. On a déterminé dans chaque échantillon l'IL-6 au moyen du système Multiplex. On a éliminé les échantillons des patientes avec des données d'infection.

**Résultats :** on a inclus 173 échantillons distribués en chacune des cinq strates. Tout au long de la gestation il existe sécrétion basale d'IL-6 à l'exsudat cervico-vaginal qui ne se modifie pas jusqu'à l'apparition du travail actif. Seulement lorsque l'activité utérine se manifeste de forme régulière et effective, il y a une augmentation très significative dans la concentration de l'IL-6 dans l'exsudat.

**Conclusions :** l'IL-6 est une cytokine pro inflammatoire qui augmente de manière spécifique lors du début de l'activité utérine effective ; elle est pour cela un élément susceptible d'être évalué comme marqueur pronostic du travail normal et avant-terme.

**Mots-clés :** interleukine-6, travail.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a secreção de IL-6 em exsudato cérvico vaginal com um corte supérfluo que imita a evolução do trabalho de parto.

**Material e método:** Tomaram amostras de exsudato cérvico vaginal de pacientes com 20 a 40 semanas de gestação que se classificaram em cinco fases de evolução do trabalho de parto. Cada fase reflete a ativação progressiva da atividade uterina e as mudanças cervicais. A cada amostra se determinou o IL-6 mediante o sistema Multiplex. Amostras de pacientes com dados de infecção foram eliminadas.

**Resultados:** Foram incluídas 173 amostras repartidas em cada uma das cinco fases. Durante o período de gestação existe a secreção basal de IL-6 no exsudato cérvico vaginal que não se altera até, que se tenha o trabalho de parto ativo. Há um aumento muito significativo na concentração de IL-6 do exsudato, somente quando a atividade uterina se manifesta de forma regular e efetiva.

**Conclusões:** IL-6 é uma citocina proinflamatória que aumenta de maneira específica quando se inicia a atividade uterina efetiva; é um elemento suscetível de ser avaliado como um marcador prognóstico do trabalho de parto normal y pretérmino.

**Palavras-chave:** interleucina-6, trabalho de parto.

Las citocinas son proteínas pequeñas que regulan una amplia gama de funciones fisiológicas en los humanos. La interleucina 6 (IL-6) es una citocina de 185 aminoácidos, glucosilada, que se sintetiza como proteína precursora de 212 aminoácidos, derivada de un gen localizado en el 7p21 del genoma humano.<sup>1</sup> Con base en su función se clasifica como miembro de la familia de citocinas que inducen la expresión de proteínas de fase aguda inflamatoria y actúa como reguladora de la biosíntesis de fibrinógeno y haptoglobina, después de daño tisular o infección.<sup>2</sup> La IL-6 es una citocina pleiotrópica relacionada con la respuesta inmunitaria antígeno específica y con reacciones inflamatorias. Es importante reguladora de la inflamación e inmunidad y se considera un enlace entre el sistema endocrino e inmunológico.<sup>3</sup>

- Este trabajo obtuvo el primer lugar del Premio Dr. José María Rodríguez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación clínica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).
- \* Dirección de Investigación.
- \*\* Departamento de Urgencias y Tococirugía.
- \*\*\* Residente de Ginecología y Obstetricia.  
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Montes Urales 800, Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel.: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Este artículo debe citarse como: Espejel NA, Godines EM, Buendía DG, Guzmán GE, Beltrán MJ, Vadillo OF. Cambios en la concentración de la interleucina 6 en exudados cervicovaginales en trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 2008;76(1):3-8.  
La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.actualizacionmedica.com.mx](http://www.actualizacionmedica.com.mx)

El grupo de células capaces de secretar IL-6 incluye: células endoteliales, fibroblastos, monocitos-macrófagos, linfocitos T y B, granulocitos, queratinocitos y células del estroma endometrial. Cada una de estas células reacciona a estímulos fisiológicos que inducen la expresión y síntesis de IL-6, tales como otras citocinas proinflamatorias, como: IL-1, TNF- $\alpha$  e interferones.<sup>4,5</sup> Su síntesis también es estimulada por endotoxinas bacterianas, oncostatina M, ARN y ADN viral. La IL-6 puede estimular o inhibir su propia síntesis, dependiendo del tipo celular. El receptor de IL-6 se expresa en células T, células B activadas por mitógenos, monocitos periféricos y algunos macrófagos y tipos celulares tumorales derivados de células B. La señal de transducción mediada por el receptor de IL-6 implica la participación de la proteína cinasa C y de la adenilato ciclasa. La IL-6 tiene un amplio límite de efectos biológicos.

Diferentes estudios clínicos han señalado que la IL-6 es un marcador muy específico de la existencia de corioamnionitis, afección que se ha relacionado directamente con la inducción de trabajo de parto prematuro y rotura prematura de membranas. El aumento de las concentraciones de IL-6 en el líquido amniótico<sup>6</sup> asociado con infección ha hecho pensar en su participación en el trabajo de parto y el nacimiento prematuro.<sup>7</sup> El trabajo de parto pretérmino es una anomalía que se inicia por múltiples causas y que, en la actualidad, se reconoce como consecuencia de la activación anormal antes del término de la gestación, de al menos algunos de los mecanismos que desencadenan el trabajo de parto normal. El proceso del trabajo de parto se define como la activación de actividad uterina,<sup>8</sup> de cambios cervicales y modificaciones estructurales en

las membranas corioamnióticas. Hace relativamente poco tiempo se demostró que el trabajo de parto se asocia con el desarrollo de respuesta inflamatoria y con incremento de todas las señales vinculadas; por ello ahora se considera que, al menos, una parte de la activación de este proceso depende del sistema inmunológico.<sup>9,10</sup> Existen suficientes demostraciones que apoyan el papel de las citocinas inflamatorias en la patogenia del trabajo de parto pretérmino y se ha comprobado el aumento de concentraciones de la mayor parte de las citocinas en el líquido amniótico, incluidas IL-1 $\beta$ ,<sup>11</sup> TNF- $\alpha$ ,<sup>12</sup> IL-6,<sup>13</sup> IL-8,<sup>14</sup> MIP-1 e IL-4.<sup>15</sup>

Estos mediadores han sido objeto de estudio en la última década y diferentes autores han propuesto la cuantificación de algunas de estas moléculas para calcular el riesgo de infección intrauterina o el propio de parto pretérmino. Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de estas citocinas en el trabajo de parto normal. En este trabajo se propone reconstruir la secuencia de evolución de expresión de la IL-6 en el trabajo de parto normal.

## MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras de exudado cervicovaginal se obtuvieron de pacientes que acudieron a consulta de control prenatal o al servicio de urgencias del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER). Se incluyeron todas las pacientes que al momento de la toma de la muestra tuvieran edad gestacional entre 20 y 40 semanas, sin complicaciones médicas u obstétricas mayores, como diabetes mellitus, diabetes gestacional o infección genitourinaria. Se solicitó, por escrito, su aceptación a participar en el protocolo de investigación.

Para documentar la actividad uterina, las modificaciones cervicales y el estado fisiológico de las membranas, las variables secundarias y confusoras necesarias para el análisis de los resultados se elaboró una hoja con la historia clínica obstétrica. De acuerdo con la información asentada en el expediente, las muestras se clasificaron en cualquiera de cinco estadios clínicos que reproducen la secuencia del perfil de activación del trabajo de parto humano.

## Criterios de inclusión

Cada grupo se integró considerando las siguientes características:

- Estadio 0: muestras de pacientes con edad gestacional entre 18 y 34 semanas, sin actividad uterina, sin cambios cervicales y con membranas fetales intactas. Este estadio representa la ausencia completa de trabajo de parto.
- Estadio 1: muestras de pacientes con irritación uterina mínima (definida por la paciente como eventos esporádicos de contracciones), sin cambios cervicales y membranas fetales intactas.
- Estadio 2: muestras de pacientes con irritación uterina mínima ( $\leq 1$  evento/30 minutos) y cambios cervicales iniciales con dilatación menor a 2 cm, sin borramiento y membranas fetales intactas.
- Estadio 3: muestras de pacientes con actividad uterina irregular ( $\leq 2$  eventos/30 min.), cambios cervicales intermedios (dilatación 1-3 cm) y membranas fetales intactas.
- Estadio 4: muestras con trabajo de parto avanzado, con contracciones uterinas efectivas y regulares, con cambios cervicales avanzados (dilatación  $>3$  cm) y membranas fetales intactas.

## Criterios de exclusión y eliminación

Se excluyeron las pacientes con demostración clínica de infección cervicovaginal y se eliminaron las que resultaron positivas a infección luego de un cultivo microbiológico del exudado cervicovaginal. Las pacientes que refirieron haber tenido relaciones sexuales en las 24 h previas también se excluyeron.

## Exudado cervicovaginal

Para la toma de la muestra se utilizó un hisopo de dacrón estéril y un tubo de transporte con 1 mL de amortiguador (Tris-base 0.05M, NaCl 0.15M, BSA 1%, Tween-20 al 0.1%). El hisopo se frotó en el fondo del saco de Douglas, auxiliándose con un espejo vaginal lubricado con solución salina, e inmediatamente después se sumergió el hisopo en la solución amortiguadora de extracción, durante el transporte se almacenó a 4°C. El extracto del tubo se centrifugó a 2000 rpm x g, a 4°C durante 15 minutos, para precipitar el material particulado y

se colectó el sobrenadante; la muestra se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis.

### Determinación de IL-6

La detección y cuantificación de citocinas se realizó con el sistema de detección múltiple de moléculas en suspensión Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, Cal.). El principio del método consiste en la combinación de dos técnicas: el ELISA que atrapa una proteína entre dos anticuerpos (uno de captura adherido a una superficie sólida y otro de detección que se marca con biotina), ambos anticuerpos específicos se unen mutuamente en sitios exclusivos de la proteína. La segunda técnica es la citometría de flujo, que puede separar y cuantificar células marcadas con fluorocromos, a partir de una mezcla. Las células se aspiran y su separación se realiza al incidir sobre cada una de ellas diferentes láser, que determinan el tamaño, granularidad o si las células están marcadas; con esto se realiza la detección, determinación y tamaño. Cada grupo de esferas muestra tonalidades idénticas para que una vez cubiertas con el anticuerpo monoclonal de captura puedan separarse al momento de la lectura. Siguiendo las recomendaciones del fabricante se utilizó una microplaca de 96 pozos y se colocaron  $50\text{ }\mu\text{L}$ /pozo del cóctel de microesferas conjugadas con anticuerpos monoclonales específicos contra IL-6. Enseguida se agregaron  $50\text{ }\mu\text{L}$ /pozo de cada uno de los estándares y de las muestras de exudado cervicovaginal; se dejaron en incubación durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante de 500 rpm. La detección de la proteína se realiza con un cóctel de anticuerpos policlonales marcados con biotina, se agregan  $25\text{ }\mu\text{L}$ /pozo del cóctel y se deja en incubación durante una hora en las condiciones descritas. Enseguida se utiliza una molécula reportera, con marcaje fluorescente (estreptavidina-ficoeritrina) y  $50\text{ }\mu\text{L}$ /pozo de la dilución y se deja, nuevamente, en incubación durante 30 minutos. Por último, las microesferas se resuspenden en  $125\text{ }\mu\text{L}$  de amortiguador de ensayo, con agitación de 1100 rpm durante 30 segundos; entre cada uno de los pasos se realizan tres lavados por aspiración, con solución amortiguadora de lavado. La lectura de la placa se realiza en plataforma Luminex (Bio-Plex de Bio-Rad), en donde las esferas se aspiran para hacerlas pasar

por un canal en donde cada una es incidida por dos diferentes láser. El primero, en rojo, excita la esfera y detecta el código de la misma, discriminando entre una molécula y otra; el segundo láser (verde) excita el marcaje fluorescente y, de esta forma, cuantifica la señal emitida por cada una de las esferas. El equipo cuenta con un software de análisis que permite la utilización de métodos de regresión de cinco parámetros que dan como resultado la concentración en  $\text{pg/mL}$  de la IL-6.

En cada estadio las concentraciones se compararon con ANOVA y se aceptaron diferencias significativas con el valor de  $p < 0.05$ .

### RESULTADOS

De acuerdo con los criterios de inclusión descritos se incluyeron 173 muestras de exudado cervicovaginal, 48 de ellas se agruparon en el estadio 0; 22 en el estadio 1, 34 en el estadio 2, 41 para el estadio 3 y 28 en el estadio 4.

A cada una de las muestras se le determinó la concentración de IL-6 (figura 1). Se apreció que en el estadio 0 la secreción de la citocina fue mínima, pero detectable en la mayor parte de las muestras; aunque es posible observar el incremento a partir de los primeros indicios de inicio de actividad uterina, sólo es diferente estadísticamente del estadio 0 al 1. Sin embargo, el aumento en la secreción de la citocina fue muy considerable hacia el estadio 4, luego de haberse iniciado el trabajo. Al comparar el estadio 0 contra el estadio 4 el valor fue de  $p=0.000$  y la comparación del estadio 3 y 4 de  $p=0.009$ .

### DISCUSIÓN

Una de las citocinas más estudiadas en relación con el trabajo de parto pretérmino es la IL-6, debido a su fuerte asociación clínica con la infección intrauterina y el inicio del parto pretérmino. Puesto que se trata de una molécula amplificadora de la respuesta inflamatoria, durante el embarazo se le ha relacionado de manera directa con infecciones del aparato reproductor. La mayor parte de los estudios reportados en la bibliografía se orientan al papel de la IL-6 en la respuesta a la infección;

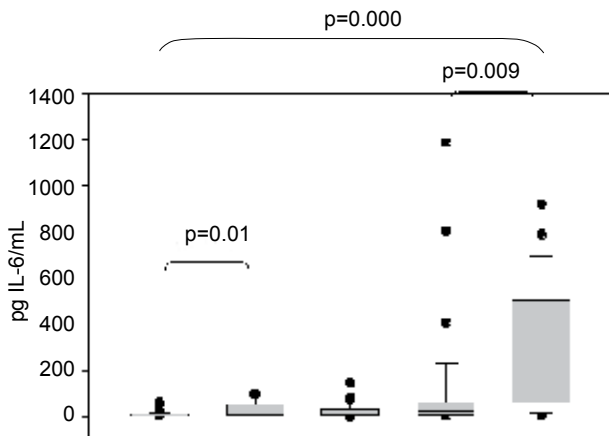


**Figura 1.** Perfil de secreción de IL-6 durante los cuatro estadios de evolución del trabajo de parto. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25-75, las barras muestran los percentiles 5-95. En el estadio más avanzado en actividad se observa un importante incremento en la secreción de IL-6. En los estadios anteriores (1-3) no existen diferencias en la secreción. La gráfica muestra los estadios en que se detectan diferencias significativas en  $p < 0.05$ .

sin embargo, no existe suficiente información de su comportamiento en el desarrollo del trabajo de parto normal. En nuestro estudio demostramos que existe una correlación estrecha entre el desarrollo del parto efectivo y la expresión de la citocina en el exudado cervicovaginal, en ausencia de infección y utilizando una reconstrucción de la secuencia progresiva del trabajo de parto. La mayor parte de los trabajos previos se enfocan a la medición de la concentración de la citocina alrededor del inicio del trabajo de parto. Hasta la fecha no se había dejado constancia del cambio que nosotros mostramos en este trabajo y que permite reforzar el concepto de que la IL-6 forma parte de la cadena de eventos que acompañan al desencadenamiento del trabajo de parto en el humano.

En la clínica obstétrica es de vital importancia la detección oportuna del trabajo de parto pretérmino, el tratamiento del mismo y el pronóstico para ese embarazo en particular. En este último contexto es primordial anticipar los embarazos en que a pesar del tratamiento adecuado prevalezca el riesgo de nacimiento pretérmino a corto y mediano plazo, debido a que en estos casos deben dirigirse todos los recursos

humanos y materiales para poner a la paciente y al feto en las mejores condiciones, en caso de que el curso del embarazo evolucione hacia un nacimiento pretérmino.

Cuando la paciente tiene antecedentes de parto pretérmino y busca atención médica, el clínico se enfrenta al problema de discernir si debe hospitalizarla para tratamiento y vigilancia del embarazo por el alto riesgo de nacimiento pretérmino en las siguientes 24 a 48 h o puede tratarla con éxito en el servicio de urgencias y enviarla a su domicilio para continuar la vigilancia de su embarazo como externa. Muchas veces esta decisión se basa en criterios subjetivos y en la experiencia anecdótica del médico, no en experiencias científicas probadas. Ésta es una de las razones por la que deben buscarse herramientas nuevas que permitan al clínico contar con elementos para fundamentar la toma de sus decisiones. La caracterización del perfil de la IL-6 puede ser el primer paso para diseñar protocolos de investigación y evaluar su probable utilidad clínica para distinguir casos reales de trabajo de parto pretérmino inminente.

## REFERENCIAS

1. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Science* 1997;6:929-55.
2. Sehgal PB, Grieninger G, Tosato G. Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:1-583.
3. Hirano T. Interleukin-6. In: Thomson A, Lotze M, editors. *The cytokine handbook*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego (CA): Academic Press, 2003;pp:197-228.
4. Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Lundin-Schiller S, Mitchell MD. Biosynthesis of interleukin-6 by cultured human chorion laeve cells: regulation by cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1081-6.
5. Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6 and 8 and tumor necrosis factor-alpha) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1855-61; discussion 1861-2.
6. Romero R, Avila C, Santhanam U, Sehgal PB. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.
7. Lange M, Chen FK, Wessel J, Buscher U, Dudenhausen JW. Elevation of interleukin-6 levels in cervical secretions as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003;82: 326-29.
8. Challis JRG, Sloboda DM, Alfaidy N, Lye SJ, et al. Prostaglan-

- dins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 2002;124: 1-17.
9. Grenache DG, Hankins K, Parvin CA, Gronowski AM. Cervico-vaginal interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-2 receptor as markers of preterm delivery. *Clinical Chemistry* 2004;50(10):1839-42.
  10. Mitchell MD, Edwin S, Romero RJ. Prostaglandin biosynthesis by human decidual cells: effects of inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990;41:35-38.
  11. Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, et al. Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23.
  12. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, et al. Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1576-87.
  13. Dudley DJ, Hunter C, Mitchell MD, Varner MW. Clinical value of amniotic fluid interleukin-6 determinations in the management of preterm labor. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101:592-7.
  14. Jacobson B, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. *BJOG* 2005;112(6):719-24.
  15. Dudley DJ, Hunter C, Varner MW, Mitchell MD. Elevation of amniotic fluid interleukin-6 concentrations in women with preterm labor and chorioamnionitis. *Am J Perinatol* 1996;13(7):443-7.

En el parto espontáneo todo está dispuesto para que la asepsia de los órganos internos perdure. El feto, el líquido amniótico y la placenta, que vienen de regiones asépticas, producen a su paso un verdadero barrido de las vías genitales. Al revés, la mano que explora y los instrumentos pueden siempre hacer penetrar en las vías vaginales gérmenes que pululen en la vulva.

**Reproducido de:** Fabre. Manual de obstetricia. Barcelona: Salvat Editores, 1941;p:180.

## Prevalencia y factores asociados con infección por virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide•

Wendoline Rojo Contreras,<sup>\*,\*\*</sup> Héctor Montoya Fuentes,<sup>1</sup> Jorge I Gámez Nava,<sup>\*,2</sup> Ángel E Suárez Rincón,<sup>1,3</sup> Jesús Vázquez Salcedo,<sup>4</sup> Miguel Padilla Rosas,<sup>1</sup> Luz M Baltazar Rodríguez,<sup>\*\*\*\*</sup> Xochitl Trujillo,<sup>\*\*\*</sup> Mario Ramírez Flores,<sup>\*\*\*</sup> Benjamín Trujillo Hernández,<sup>\*\*\*</sup> Laura González López<sup>5,2</sup>

Nivel de evidencia: II-2

### RESUMEN

**Antecedentes:** a pesar de su vínculo con el cáncer cervicouterino, no existe información acerca de la prevalencia de infección por virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide.

**Objetivo:** evaluar la prevalencia de infección por virus del papiloma humano, corroborada mediante pruebas de biología molecular, y analizar los factores relacionados con esta infección en pacientes con artritis reumatoide.

**Material y método:** estudio transversal, analítico, al que se incluyeron 250 pacientes: 61 mujeres con artritis reumatoide seleccionadas de la consulta externa de reumatología de un hospital de segundo nivel de atención y 189 mujeres sanas que acudieron a toma de citología cervical a un hospital de primer nivel de atención. Se realizó una encuesta estructurada para factores de riesgo de infección. Por exfoliación se obtuvieron células del cuello uterino a las que se les extrajo ADN para detección de virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores consenso específicos e identificación de la enzima de restricción en los virus de alto y bajo riesgo. Se calculó la prevalencia y se realizó el análisis ajustado de factores mediante regresión logística con cálculo de razón de momios y sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

**Resultados:** la prevalencia de infección por el virus del papiloma humano en pacientes con artritis reumatoide fue de 30% y en el grupo control de 34% con razón de momios = 0.8 (IC95% 0.42 a 1.6,  $p=0.5$ ). En las mujeres con artritis reumatoide los tipos virales más frecuentes fueron de alto riesgo en 94%, con predominio de los tipos 16, 58 y 18. Los factores vinculados con mayor riesgo de infección por el virus del papiloma humano ajustado en artritis reumatoide fueron: antecedente de más de una pareja sexual (OR = 5.8, IC95% 1.1 a 31.1,  $p=0.04$ ), actividad sexual más de una vez a la semana (OR=6.7, IC95% 0.9 a 51.6,  $p=0.06$ ), pareja circuncidada (OR=9.0, IC95% 1.2 a 64.4,  $p=0.02$ ). Las pacientes y los controles no difirieron en estado civil. El 74% de las controles trabajan en contraposición del 44% de mujeres con artritis reumatoide ( $p<0.01$ ).

**Conclusión:** una de cada tres mujeres con artritis reumatoide está infectada por el virus del papiloma humano y 94% pertenecen al tipo viral de alto riesgo. Los factores relacionados con la infección incluyen, principalmente, a los de la pareja sexual, lo que implica la necesidad de detectar tempranamente la infección y la vigilancia debido al alto riesgo de displasia cervical.

**Palabras clave:** virus del papiloma humano, cervical, artritis reumatoide, prevalencia, factores asociados.

### ABSTRACT

**Background:** Nevertheless its association with cervicouterine cancer, there is no information about cervical human papillomavirus infection prevalence in patients with rheumatoid arthritis.

**Objective:** To evaluate human papillomavirus infection prevalence through molecular biology tests, and to analyze this infection related factors in patients with rheumatoid arthritis.

**Material and method:** Analytic, transversal study to 250 patients: 61 women with rheumatoid arthritis selected from a rheumatologic external consult of a second level hospital, and 189 healthy women, with cervical cytology, of a first level hospital. They were polled to find infection risk factors. They were exfoliated to get cervix cells to extract its DNA and detect human papillomavirus (chain reaction of polymerase with specific consensus markers), and identification of restriction enzyme in high and low risks viruses. Prevalence was calculated, and adjusted factors analysis was performed through logistic regression with odds ratio and confidence intervals of 95%.

**Results:** Prevalence of papillomavirus infection in patients with rheumatoid arthritis was 30%, and in control group was 24%, with an odds ratio of 0.8 (CI95% 0.42-1.6,  $p=0.5$ ). Ninety-four percent of the most frequent viral types in women with rheumatoid arthritis were high risk (mainly types 16, 58, and 18). Factors associated with higher human papillomavirus adjusted to rheumatoid arthritis were: more than one sexual partner (OR = 5.8 CI95% 1.1-31.1,  $p=0.04$ ), more than one sexual intercourse weekly (OR = 6.7, CI95% 0.9-51.6,  $p=0.06$ ), circumcised sexual partner (OR = 9.0, CI95% 1.2-64.4,  $p=0.02$ ). Patients and controls had same values of marital status. Seventy-four percent of controls worked, compared to 44% of women with rheumatoid arthritis ( $p<0.01$ ).

**Conclusion:** One out of three women with rheumatoid arthritis has human papillomavirus infection and 94% has the high-risk viral type. Infection associated factors mainly includes sexual partner ones; due to high risk of cervical dysplasia, it is necessary the early detection of the infection and surveillance.

**Key words:** cervical human papillomavirus, rheumatoid arthritis, prevalence, associated factors.

## RÉSUMÉ

**Antécédents** : nonobstant son lien avec le cancer cervico-utérin, il n'existe pas d'information sur la prévalence d'infection par virus du papillome humain cervical en patientes avec arthrite rhumatoïde.

**Objectif** : évaluer la prévalence d'infection par virus du papillome humain corroboré au moyen de tests de biologie moléculaire et faire l'analyse des facteurs liés à cette infection en patientes avec arthrite rhumatoïde.

**Matériel et méthode** : étude transversale, analytique, auprès de 250 patientes : 61 femmes avec arthrite rhumatoïde sélectionnées dans la consultation externe de rhumatologie d'un hôpital de deuxième niveau d'attention et 189 en bonne santé qui ont été accueillies pour prélèvement de cytologie cervicale dans un hôpital de premier niveau. On a réalisé une enquête structurée pour facteurs de risque d'infection. Par exfoliation on a obtenu des cellules du col utérin auxquelles on a extrait ADN pour détection de virus du papillome humain (réaction en chaîne de la polymérase avec déclencheurs consensus spécifiques) et identification de l'enzyme de restriction dans les virus de haut et faible risque. On a calculé la prévalence et on a réalisé l'analyse ajustée des facteurs au moyen de régression logistique avec calcul de rapport des côtes et leurs intervalles de confiance de 95%.

**Résultats** : la prévalence d'infection par le virus du papillome humain en patientes avec arthrite rhumatoïde a été de 30% et dans le groupe contrôle de 34% avec rapport des côtes de 0.8 (IC95% 0.42 à 1.6,  $p = 0.5$ ). Chez les femmes avec arthrite rhumatoïde les types viraux les plus fréquents ont été de haut risque en 94% (surtout les types 16, 58 et 18). Les facteurs liés avec risque majeur d'infection par le virus du papillome humain ajusté en arthrite rhumatoïde ont été : antécédent de plus d'un couple sexuel (OR = 5.8, IC95% 1.1 à 31.1,  $p = 0.04$ ), activité sexuelle plus d'une fois chaque semaine (OR = 6.7, IC95% 0.9 à 51.6,  $p = 0.06$ ), couple circoncis (OR = 9.0, IC95% 1.2 à 64.4,  $p = 0.02$ ). Les patientes et les contrôles n'ont pas de différence quant à l'état civil. 74% des contrôles travaillent, contrairement à 44% de femmes avec arthrite rhumatoïde ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion** : une sur trois femmes avec arthrite rhumatoïde est infectée par le virus du papillome humain et 94% appartient au type viral de haut risque. Les facteurs liés à l'infection incluent, principalement, ceux du couple sexuel, ce qui implique le besoin de détecter précocement l'infection et la surveillance en raison du haut risque de dysplasie cervicale.

**Mots-clés** : virus du papillome humain cervical, arthrite rhumatoïde, prévalence, facteurs associés.

## RESUMO

**Antecedentes**: Não obstante, seu vínculo com o câncer cérvico uterino, não existe informação sobre a prevalência de infecção pelo vírus de papiloma humano cervical em pacientes com artrite reumática.

**Objetivo**: Avaliar a prevalência de infecção pelo vírus de papiloma humano, confirmada mediante provas de biologia molecular e analisar os fatores relacionados com esta infecção em pacientes com artrite reumática.

**Material e método**: Estudo transversal e analítico em 250 pacientes: 61 mulheres com artrite reumática selecionadas de consulta externa de reumatologia de um hospital de segundo nível de atenção e 189 mulheres saudáveis que foram ao exame de citologia cervical de um hospital de primeiro nível. Foi realizada uma pesquisa de fatores de riscos de infecção. Através de esfoliação se obteve células do colo do útero que foi extraído DNA para detectar o vírus de papiloma humano (reação em cadeia da polimerase com iniciadores consenso específicos) e identificação da enzima de restrição do vírus de alto e baixo risco. Foi calculado a prevalência e realizado a análise ajustada de fatores, mediante regressão logística com cálculo de razão de múmias e seus intervalos de segurança de 95%.

**Resultados**: A prevalência de infecção pelo vírus de papiloma humano em pacientes com artrite reumática foi de 30%, e no grupo de controle de 34% com razão de múmias de 0,8 (IC95% 0,42 a 1,6  $p = 0,5$ ). Nas mulheres com artrite reumática, os tipos de vírus mais frequentes foram de alto risco em 94% (sobre todos os tipos 16, 58 y 18). Os fatores vinculados com maior risco de infecção pelo vírus de papiloma humano com a artrite reumática foram: antecedente de mais de um parceiro sexual (OR = 5,8 IC95% 1,1 a 31,1  $p = 0,04$ ), atividade sexual mais de uma vez por semana (OR = 6,7, IC95% 0,9 a 51,6  $p = 0,06$ ) parceiro circuncidado (OR = 9,0, IC95% 1,2 a 64,4  $p = 0,02$ ). Entre pacientes e controles o estado civil não interferiu. Em 74% das controles trabalham, e em contraposição de 44% das mulheres com artrites reumática ( $p < 0,01$ ).

**Conclusão**: Uma de cada três mulheres com a artrite reumática está infectada com o vírus de papiloma humano e 94% pertence ao tipo viral de alto risco. O fatores relacionados com a infecção incluem, principalmente, dos parceiros sexuais, o que implica a necessidade de detectar bem cedo a infecção e a vigilância devido ao alto risco de displasia cervical.

**Palavras-chave**: vírus do papiloma humano, artrite reumática, prevalência, fatores associados.

El deterioro de la respuesta inmunitaria en pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas puede favorecer el inicio y progresión de infecciones. Algunos fármacos utilizados para tratar estas afecciones repercuten en la respuesta inmunitaria humoral y celular, circunstancia que puede acelerar la replicación viral.<sup>1</sup>

La artritis reumatoide es una enfermedad que predomina en el sexo femenino (3:1) y su edad de inicio es entre los 25 y 50 años.<sup>2</sup> Afecta a mujeres durante sus años reproductivos y post-reproductivos. El tamizaje de lesiones en el cuello uterino de mujeres con artritis reumatoide es importante porque la identificación oportuna de infecciones sexualmente transmisibles,

como la del virus del papiloma humano, puede acompañarse de estrategias que prevengan la progresión a cáncer cervical, que es uno de los pocos cánceres con lesiones precancerosas susceptible de detección y tratamiento oportuno.<sup>3</sup> La infección por virus del papiloma humano es la más frecuente de las infecciones de transmisión sexual.<sup>4</sup> Existen demostraciones epidemiológicas actuales que señalan que alrededor de 90% del cáncer de cuello uterino puede relacionarse con algunos tipos de virus del papiloma humano,<sup>5</sup> su participación es sinérgica en el inicio de lesiones premalignas y carcinomas del cuello uterino. En la evolución de estas lesiones es necesario contemplar la respuesta inmunitaria del paciente y la coexistencia de factores ambientales y del huésped.<sup>6</sup> Existen factores de riesgo asociados con la infección del virus del papiloma humano que incluyen a los tradicionales y los relacionados con la disminución de la inmunidad celular del paciente.<sup>7</sup> En la actualidad, la prevalencia en México de infección por

virus del papiloma humano descansa, principalmente, en los resultados de citología cervical (método con alta tasa de falsos positivos y negativos).<sup>8</sup> Sólo unos cuantos estudios han evaluado esta prevalencia en un limitado número de pacientes en quienes se aplican técnicas de biología molecular.<sup>9</sup>

Los autores realizamos una búsqueda sistemática en mujeres con artritis reumatoide mediante las palabras clave: *human papillomavirus* y *rheumatoid arthritis* y no encontramos ningún estudio de prevalencia de la infección por virus del papiloma humano cervical en estas mujeres, las cuales tienen alteraciones en la inmunidad humoral y celular derivadas de la enfermedad y de algunos tratamientos que pueden condicionar mayor proporción de neoplasias. Debido a esta falta de información en la bibliografía en un estudio evaluamos la prevalencia de la infección identificada por técnicas de biología molecular, tipos de virus y factores asociados con la infección por virus del papiloma humano cervical en mujeres con artritis reumatoide.

## PACIENTES Y MÉTODO

**Diseño:** estudio transversal analítico. **Universo de trabajo:** de julio de 2005 a septiembre de 2006 se incluyeron 250 mujeres: 61 con artritis reumatoide que acudieron en forma consecutiva a la consulta externa de reumatología de un hospital de segundo nivel de atención y a 189 mujeres sanas, controles, que acudieron consecutivamente a toma de citología cervical a un hospital de primer nivel de atención. Los criterios de inclusión para artritis reumatoide fueron: mujeres de 18 a 55 años de edad, con vida sexual activa y diagnóstico de artritis reumatoide de acuerdo con los criterios del Colegio Americano de Reumatología 1987, heterosexuales y aceptación por escrito para participar en el estudio. Los criterios de inclusión para el grupo control fueron: mujeres de 18 a 55 años de edad, con vida sexual activa, heterosexuales y aceptación por escrito para participar en el estudio. En ambos grupos se excluyó a quienes tuvieran histerectomía, embarazo o antecedentes de cáncer cérvico-uterino.

## Desarrollo del estudio

A ambos grupos se les realizó una encuesta estructurada de factores de riesgo para infección por virus

- Este trabajo obtuvo el segundo lugar del Premio Dr. José María Rodríguez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación clínica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Lo financiaron el IMSS, Fondo de Fomento a la Investigación (FP-2003/095) y el Instituto Científico Pfizer.
- \* Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México.
- \*\* Programa de Posgrado en Ciencias Médicas.
- \*\*\* Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas.
- \*\*\*\* Facultad de Medicina.
- Universidad de Colima, Colima, Colima, México.
- <sup>1</sup> División de Medicina Molecular. Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México.
- <sup>2</sup> Programa de Posgrado en Salud Pública. Centro Universitario en Ciencias de la Salud.
- Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- <sup>3</sup> Jefatura de enseñanza e investigación, Hospital Regional núm. 45, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México.
- <sup>4</sup> Clínica de displasias.
- <sup>5</sup> Departamento de Medicina Interna-Reumatología.
- Hospital General Regional núm. 110, IMSS, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondencia: Dra. Wendoline Rojo Contreras. José Fernández Rojas núm. 3515, colonia Jardines del Nilo, CP 44860, Guadalajara, Jalisco, México. E-mail: dra\_wendolinerojo@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como: Rojo CW, Montoya FH, Gámez NJI y col. Prevalencia y factores asociados con infección por virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide. *Ginecol Obstet Mex* 2008;76(1):9-17. La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.actualizacionmedica.com.mx](http://www.actualizacionmedica.com.mx)

del papiloma humano que incluyó: fecha de inicio de la vida sexual activa, número de parejas sexuales, periodicidad de la actividad sexual por semana, tener o no circuncisión la pareja o ser migrante a Estados Unidos; además de antecedentes clínicos y sociodemográficos. En las pacientes con artritis reumatoide se identificaron las características de la enfermedad, tratamientos utilizados, en especial inductores de remisión o inmunosupresores.

### Citología cervical y toma de muestra para estudios de biología molecular

A las pacientes con artritis reumatoide y a las controles se les dio cita específica para que las atendiera una investigadora adiestrada que siguió un protocolo para la toma de citología. Se obtuvo una muestra cervical mediante la introducción de un espéculo vaginal estéril desechable. Con control visual se obtuvieron células del endocervix y de la zona de transformación que se colectaron por exfoliación con un cito-cepillo estéril que se rotó 360 grados en el orificio cervical externo. Las células se depositaron en un tubo Eppendorf de 2.5 mL con solución salina estéril,<sup>10</sup> previamente preparadas en una cámara de flujo laminar, luego se almacenaron a -20°C, hasta su procesamiento (figura 1). Al mismo tiempo se envió la muestra a citología cervical.

### DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

La obtención del ADN de la muestra cervical la determinó un investigador cegado a las características clínicas y al grupo del que se obtuvo la muestra. El ADN se extrajo siguiendo la técnica estandarizada de Wright y Manos,<sup>11</sup> la cantidad y pureza del ADN extraído se estimaron mediante un método espectrofotométrico y la calidad por detección del gen constitutivo EP3 y EP13. La amplificación del genoma viral se realizó por PCR. Las regiones más conservadas se encuentran en los marcos de lectura abierta E1 y L1; E1 fue la más adecuada y con los iniciadores CpI y CpIIIG, que fue capaz de identificar los tipos virales 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56 y 58, entre otros, los cuales representan 99% de los virus del papiloma humano más frecuentes en la población mundial. Para la amplificación del ADN

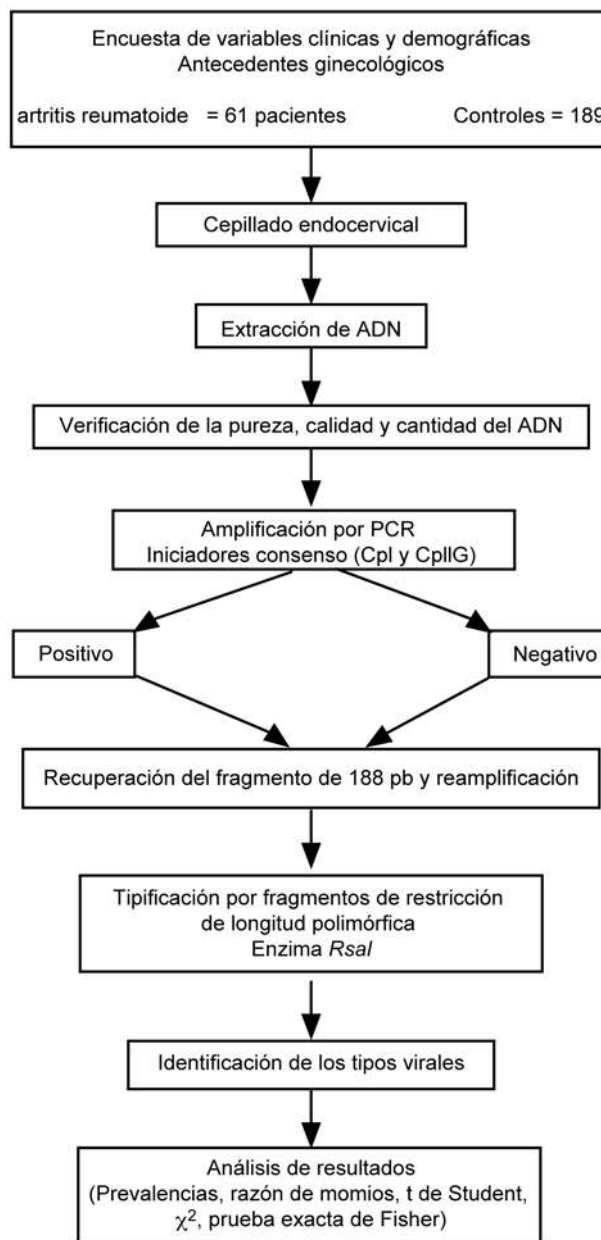


Figura 1. Diagrama de flujo.

se utilizaron alícuotas de 2 µL (100 ng/µL) y la PCR constó de 32 ciclos.<sup>12</sup>

CpIIIG 5' ATG TTA ATW SAG CCW CCA AAA  
TT 3'

CpI 5' TTA TCA WAT GCC CAY TGT ACC AT 3'  
W = A o T, S = C o G, Y = C o T.

El fragmento resultante de 188 pares de bases (pb) se evidenció mediante electroforesis en gel de poliácridamida al 6% (29:1) en buffer TBE 1X, 80 volts durante cinco minutos, posteriormente se incrementó el voltaje a 140 durante 1.5 horas. Se utilizó pBR322 digerido con *Msp I* como marcador de peso molecular (figura 2).<sup>13</sup>

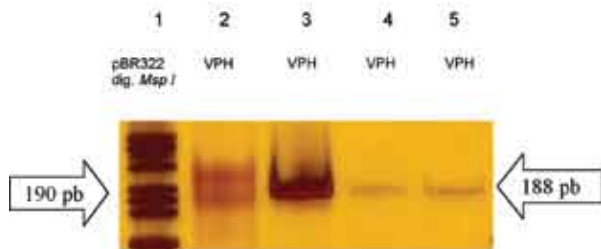


**Figura 2.** Evidencia de infección por virus del papiloma humano en gel de poliácridamida. Gel de poliácridamida al 6% (29:1) en buffer TBE 1 X. Carril 1: Marcador de peso molecular pBR 322 digerido con *MspI* carril 2, 3, 4 y 5: Muestras positivas para VPH.

### Identificación de los tipos virales

La enzima *Rsa I*, que reconoce la secuencia 5' GT/AC 3', posee al menos un sitio de corte para los virus del papiloma humano más frecuentes en diferentes poblaciones, los cuales se han implicado en cáncer cervicouterino, papilomatosis respiratoria recurrente y carcinoma faringo-amigdalino, entre otros tumores (figura 3).<sup>12</sup> En cada amplificación se utilizaron controles negativos y positivos para asegurar la no contaminación de las muestras en los diferentes pasos del procedimiento: descontaminación previa de las áreas de trabajo a la manipulación de las muestras mediante el uso de solución de SDS 0.5% Y DEPC 0.1% y uso de cubre-bocas y guantes estériles.

### Tamaño de la muestra

Para calcular el tamaño de muestra se utilizó el programa EpiInfo 6 y se obtuvo una prevalencia estimada del virus del papiloma humano de 20% en población general,<sup>9,10</sup> contra una prevalencia esperada de 40% en pacientes con artritis reumatoide, con potencia de 80% y nivel de confianza del 95% y una relación no expuestos a expuestos de 3:1, el grupo de interés (artritis reumatoide) está integrado por 60 elementos, mientras que el grupo de referencia (control) se calculó con una

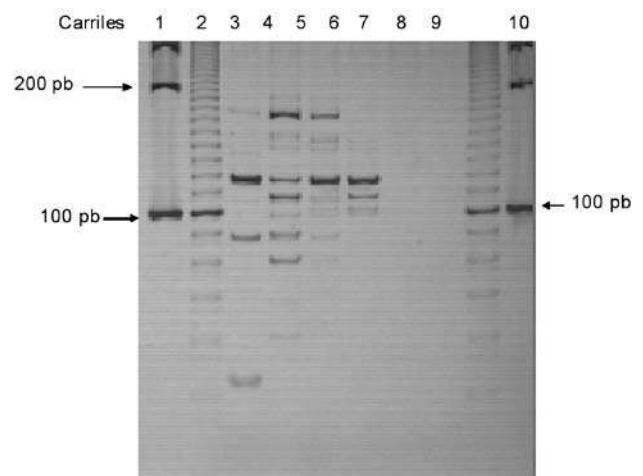


**Figura 3.** Identificación de los tipos virales con enzima *Rsa I* en gel de poliácridamida al 12%. Electroforesis en poliácridamida al 12% (19:1). Carriles 1 y 10: escalera de 100 pb; carriles 2 y 9: escalera de 10 pb; carril 3: positivo para VPH 18 y tipo desconocido; carril 4: positivo para VPH 6, 16, 18, 33 y 35; carril 5: positivo para VPH 6, 16, 18 y 35; carril 6: positivo para VPH 6 y 16; carril 7: blanco de amplificación; carril 8: control negativo digerido con la enzima *Rsa I*.

relación 3:1. Por lo tanto, la muestra mínima fue de: 60 con artritis reumatoide y 180 del grupo control.

### Análisis estadístico

Se calculó la prevalencia e intervalos de confianza del 95% para infección en ambos grupos. Se calculó un estimado de riesgo para infección basado en razón de momios (OR). El análisis bivariado se realizó mediante ji al cuadrado y, en su caso, prueba exacta de Fisher para comparación de proporciones y t de Student para comparación de medias entre pacientes con artritis reumatoide y controles. Para evaluar las diferencias entre pacientes con artritis reumatoide se realizó un enfoque estadístico similar, quienes tuvieron virus del papiloma humano (+) versus quienes tuvieron virus del papiloma humano (-). Para evaluar factores de riesgo vinculados con la infección por virus del papiloma humano se realizó un análisis multivariado de regresión logística en el que se utilizó como variable dependiente la coexistencia de infección por virus del papiloma humano y como covariadas las que dieron  $p < 0.10$  en el análisis univariado. Se consideró valor de significación estadística a la  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis se realizaron en SPSS versión 8.0.

### Consideraciones éticas

El proyecto lo aprobó el comité de investigación (número de aprobación 2003-004-110-048). A todas las mujeres se les solicitó su consentimiento informado, se les indicaron los objetivos del estudio y sus derechos a rehusar la participación, el manejo de la información fue confidencial y con fines científicos, se dio una copia del resultado a su reumatólogo y a su médico familiar, con el fin de dar seguimiento en caso necesario.

### Conflicto de interés

El proyecto fue apoyado por el IMSS, a través del Fondo de Fomento a la Investigación y el Instituto Científico Pfizer, como parte de un concurso nacional de protocolos de investigación no dependientes de la industria farmacéutica. Ningún autor o paciente recibió compensación económica alguna por su participación en el estudio.

## RESULTADOS

En el cuadro 1 aparece la comparación bivariada de las características generales e historia ginecoobstétrica

de ambos grupos. La edad promedio fue menor en el grupo control que en el de artritis reumatoide ( $36 \pm 8$  vs  $40 \pm 8$  años,  $p < 0.001$ ); la escolaridad fue mayor en el grupo control ( $11 \pm 4$  vs  $8 \pm 4$ ,  $p < 0.001$ ); las controles tuvieron mayor proporción de relaciones sexuales (más de una vez a la semana  $74$  vs  $44\%$   $p < 0.001$ ); las pacientes con artritis reumatoide iniciaron su vida sexual activa a más temprana edad ( $19 \pm 3$  vs  $21 \pm 5$  años,  $p < 0.001$ ).

La prevalencia de infección por el virus del papiloma humano cervical en mujeres con artritis reumatoide fue de  $30\%$  (IC95%  $20$  a  $42\%$ ) y en el grupo control de  $34\%$  (IC95%  $28$  a  $41\%$ ), sin diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de infección entre ambos grupos (OR=  $0.8$ , IC95%  $0.42$  a  $1.6$ ,  $p=0.5$ ).

En el cuadro 2 se realiza un análisis bivariado de factores relacionados con la infección por virus del papiloma humano en pacientes con artritis reumatoide. Hubo tendencia a más frecuencia de infección a menor edad, más de una pareja sexual, antecedente de migración de la pareja sexual a Estados Unidos y relaciones sexuales más de una vez a la semana. En el cuadro 3 se señala que en las pacientes con artritis reumatoide se encontró mayor frecuencia de tipos vi-

**Cuadro 1.** Características generales e historia ginecoobstétrica de las pacientes con artritis reumatoide y controles

| Características                                    | Artritis reumatoide n = 61 | Controles n = 189 | Valor de p <sup>†</sup> |
|----------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|
| Edad (años), media $\pm$ DE                        | $40 \pm 8$                 | $36 \pm 8$        | $< 0.001$               |
| Escolaridad (años), media $\pm$ DE                 | $8 \pm 4$                  | $11 \pm 4$        | $< 0.001$               |
| Primaria o menos, n (%)                            | 27 (44)                    | 27 (14)           | $< 0.001$               |
| Casada-uni3n libre, n (%)                          | 44 (77)                    | 137 (73)          | 0.5                     |
| Empleo remunerado, n (%)                           | 27 (44)                    | 109 (74)          | $< 0.001$               |
| Tabaquismo, n (%)                                  | 15 (25)                    | 57 (30)           | 0.4                     |
| Menarquia (años), media $\pm$ DE                   | $13 \pm 2$                 | $13 \pm 2$        | 0.2                     |
| IVSA (años), media $\pm$ DE                        | $19 \pm 3$                 | $21 \pm 5$        | $< 0.001$               |
| Más de una pareja sexual, n (%)                    | 26 (43)                    | 73 (39)           | 0.6                     |
| Actividad sexual más de una vez a la semana, n (%) | 23 (44)                    | 116 (74)          | $< 0.001$               |
| Pareja circuncidada, n (%)                         | 12 (20)                    | 63 (34)           | 0.05                    |
| Pareja emigrada a Estados Unidos, n (%)            | 16 (27)                    | 37 (20)           | 0.2                     |
| Embarazos, media $\pm$ DE                          | $3 \pm 2$                  | $3 \pm 2$         | 0.2                     |
| Uso de hormonales (meses), n (%)                   | 36 (59)                    | 96 (51)           | 0.1                     |
| Infecciones vaginales previas, n (%)               | 46 (75)                    | 137 (76)          | 0.6                     |

<sup>†</sup> Comparación de variables cuantitativas: t de Student. Comparación de variables cualitativas:  $\chi^2$ . \* Prueba exacta de Fisher. DE: desviación estándar.

**Cuadro 2.** Factores asociados con infección por virus del papiloma humano en pacientes con artritis reumatoide

| Características                                      | Detección de la infección por PCR |                   | Valor de $p^{\dagger}$ |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
|                                                      | Negativo $n = 43$                 | Positivo $n = 18$ |                        |
| Edad (años), media $\pm$ DE                          | 41 $\pm$ 7                        | 37 $\pm$ 9        | 0.06                   |
| Casada-unión libre, $n$ (%)                          | 34 (80)                           | 13 (72)           | 0.6                    |
| Escolaridad (años), media $\pm$ DE                   | 8 $\pm$ 4                         | 9 $\pm$ 3         | 0.2                    |
| Primaria o menos, $n$ (%)                            | 21 (49)                           | 6 (33)            | 0.3                    |
| Empleo remunerado, $n$ (%)                           | 16 (37)                           | 11 (61)           | 0.09                   |
| Tabaquismo, $n$ (%)                                  | 10 (23)                           | 5 (28)            | 0.7                    |
| IVSA (años), media $\pm$ DE                          | 19 $\pm$ 3                        | 19 $\pm$ 3        | 0.8                    |
| Más de una pareja sexual, $n$ (%)                    | 15 (35)                           | 11 (61)           | 0.06                   |
| Actividad sexual más de una vez a la semana, $n$ (%) | 20 (51)                           | 3 (23)            | 0.08                   |
| Pareja circuncidada, $n$ (%)                         | 6 (14)                            | 6 (35)            | 0.08                   |
| Pareja emigrada a Estados Unidos, $n$ (%)            | 8 (19)                            | 8 (44)            | 0.06                   |
| Embarazos, media $\pm$ DE                            | 3 $\pm$ 2                         | 3 $\pm$ 2         | 0.1                    |
| Tratamiento con hormonales orales, $n$ (%)           | 28 (65)                           | 8 (44)            | 0.1                    |
| Infecciones vaginales previas $n$ (%)                | 31 (72)                           | 15 (83)           | 0.4                    |

$\dagger$  Comparación de variables cualitativas:  $\chi^2$ . Comparación de variables cuantitativas:  $t$  de Student. \* Prueba exacta de Fisher.  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

**Cuadro 3.** Identificación de los tipos virales del papiloma humano (VPH) cervical

| Infección por VPH            | Artritis reumatoide $n = 18$<br>(30%) | Controles $n = 64$<br>(34%) | Valor de $p^{\dagger}$ |
|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Tipos virales                |                                       |                             |                        |
| <b>Bajo riesgo</b>           | 1 (6)                                 | 22 (35)                     | 0.02                   |
| Virus del papiloma humano 6  | 1 (6)                                 | 21 (33)                     | 0.03                   |
| Virus del papiloma humano 11 | 0 (0)                                 | 3 (5)                       | -                      |
| <b>Alto riesgo</b>           | 16 (94)                               | 52 (83)                     | 0.2                    |
| Virus del papiloma humano 16 | 7 (41)                                | 17 (27)                     | 0.2                    |
| Virus del papiloma humano 18 | 5 (30)                                | 23 (36)                     | 0.6                    |
| Virus del papiloma humano 33 | 3 (17)                                | 1 (2)                       | 0.001                  |
| Virus del papiloma humano 35 | 0 (0)                                 | 11 (17)                     | -                      |
| Virus del papiloma humano 51 | 0 (0)                                 | 2 (3)                       | -                      |
| Virus del papiloma humano 58 | 6 (35)                                | 9 (14)                      | 0.05                   |
| Virus del papiloma humano X  | 1 (6)                                 | 1 (2)                       | 0.3                    |

X: virus del papiloma humano desconocido.  $\dagger$  Comparación de variables cualitativas:  $\chi^2$ . \* Prueba exacta de Fisher.

rales de alto riesgo 16, 58 y 18 (94%, IC95% 67 a 97%), un tipo viral en 13 pacientes con artritis reumatoide (72%) y en 39 controles (61%), de dos tipos virales en cinco pacientes con artritis reumatoide (28%) y en 23 controles (36%). La infección por virus del papiloma humano en pacientes con artritis reumatoide no se relacionó con tratamiento con prednisona o inductores de remisión, ni con el tiempo de evolución de la enfermedad (datos no mostrados en el cuadro).

El cuadro 4 muestra el análisis multivariado de factores de riesgo para infección por virus del papiloma humano en pacientes con artritis reumatoide. Después de ajustar por edad y tener más de una pareja sexual, los factores asociados con infección por virus del papiloma humano fueron OR = 5.8 (IC95% 1.0 a 31.1,  $p = 0.04$ ); tener relaciones sexuales más de una vez a la semana OR = 6.7 (IC95% 0.9 a 51.6,  $p = 0.06$ ); tener una pareja que emigró a Estados Unidos tuvo una tendencia en el análisis multivariado, aunque no significativa (OR = 5.4 IC95% 0.8 a 36.1,  $p = 0.08$ ).

## DISCUSIÓN

Éste es el primer estudio que investiga la prevalencia de infección por virus del papiloma humano en pacientes con artritis reumatoide en población mexicana.

**Cuadro 4.** Análisis ajustado de factores asociados del virus del papiloma humano cervical en pacientes con artritis reumatoide

| <i>Característica</i>                       | <i>OR</i> | <i>IC 95%</i> | <i>Valor de p<sup>†</sup></i> |
|---------------------------------------------|-----------|---------------|-------------------------------|
| Edad                                        | 0.36      | 0.1 a 2.0     | 0.5                           |
| Más de una pareja sexual                    | 5.8       | 1.1 a 31.1    | 0.04                          |
| Actividad sexual más de una vez a la semana | 6.7       | 0.9 a 51.6    | 0.06                          |
| Pareja circuncidada                         | 9.0       | 1.2 a 64.4    | 0.02                          |
| Pareja emigrada a Estados Unidos            | 5.4       | 0.8 a 36.1    | 0.08                          |

OR: razón de momios.

IC 95%: intervalo de confianza 95%.

† Regresión logística.

La prevalencia encontrada en controles en nuestro estudio fue mayor que un estudio realizado en México que reportó infección por virus del papiloma humano en 17% y del tipo de alto riesgo en 58% de mujeres sanas con reportes citológicos normales.<sup>10</sup> Nosotros encontramos el tipo viral de alto riesgo en 94% de las pacientes infectadas con virus del papiloma humano en artritis reumatoide con predominio de los tipos 16, 58 y 18.

En nuestro estudio, el tratamiento con inductores de remisión e inmunosupresores no fue un factor de riesgo para la adquisición de infección por virus del papiloma humano. Aunque no hay información en la bibliografía para hacerlo comparativo con otras poblaciones con artritis reumatoide, en las de lupus eritematoso sistémico la prevalencia fue similar en China.<sup>14</sup>

Llama la atención la alta proporción de tipos de alto riesgo observados en nuestras pacientes, sobre todo el 16 y 18 que se relacionan con cáncer cervical.<sup>15</sup>

Nuestros hallazgos muestran que los factores epidemiológicos son relevantes en la infección por virus del papiloma humano. Las series de pacientes evaluadas en población no reumática muestran que existe correlación entre menos años de escolaridad y el inicio de vida sexual activa.<sup>16</sup> En estas series de pacientes sin enfermedad reumática, los aspectos de la conducta sexual, como el inicio de relaciones sexuales temprano y mayor número de parejas sexuales, incrementan el riesgo de infección por virus del papiloma humano;<sup>17</sup> sin embargo, nosotros no observamos una correlación estrecha con estas variables ni con tratamientos con hormonales, lo cual está en discusión por diferentes grupos de autores.<sup>18,19</sup>

Entre las limitaciones del estudio está el ser un estudio transversal y sólo los estudios de seguimiento podrán evaluar la incidencia y persistencia de la infección por virus del papiloma humano y su contribución a la aparición de lesión intraepitelial escamosa del cuello uterino y cáncer cérvico-uterino.

La fuerza de este estudio incluye una considerable muestra de pacientes en quienes se utilizó la técnica con PCR de alta sensibilidad para la detección y tipificación del virus del papiloma humano, además de ser el inicio de investigaciones de infección por virus del papiloma humano en población mexicana con enfermedades reumáticas sistémicas en quienes es posible dar seguimiento para apreciar la historia natural, mediante la identificación de la persistencia de la infección y la aparición de manifestaciones clínicas o histopatológicas de lesión intraepitelial cervical y cáncer cérvico-uterino que ayuden a tomar decisiones clínicas que favorezcan el pronóstico de las pacientes.

## CONCLUSIÓN

La prevalencia de infección por virus del papiloma humano es alta en pacientes con artritis reumatoide. Debido a que los principales tipos coexistentes son de alto riesgo, con mayor frecuencia en artritis reumatoide y a que estas pacientes tienen inmunosupresión ocasionada por la enfermedad y por los tratamientos, el riesgo de aparición de una neoplasia maligna puede verse incrementado. Por lo tanto, es necesario investigar esta infección y planear estrategias para disminuir el riesgo mediante educación y utilización de vacunas, principalmente contra tipos virales de

alto riesgo. Deben realizarse estudios de seguimiento que evalúen los factores de riesgo para adquisición de infección por virus del papiloma humano, la regresión de infección o progresión a lesión intraepitelial escamosa de cuello uterino y cáncer cérvico-uterino, esto podrá ofrecer respuestas si estas pacientes son susceptibles de recibir otras medidas y tratamientos distintos que quienes no están infectadas.

## REFERENCIAS

- Berthier S, Mougin C, Vercherin P. Does a particular risk associated with papillomavirus infections exist in women with lupus? *Rev Medicine Intern* 1999;20(2):128-32.
- Lipsky PE. Artritis reumatoide. En: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL y col. *Harrison: Principios de medicina interna*. 15ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2002;pp:2255-65.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, et al. The 2001 Bethesda system: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2001;287(16):2114-9.
- Lorincz A, Reid R. *Clínicas de Ginecología y Obstetricia. Temas actuales. Virus del papiloma humano. Parte II*. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996;pp:747-50.
- Muñoz N, Bosh F. Cáncer del cervix y virus del papiloma humano: evidencia epidemiológica y perspectivas para su prevención. *Salud Pública Mex* 1997;39:297-82.
- Muñoz N, Bosch F, De Sanjosé S, Herrero R, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
- Programa para la Vigilancia, Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Control del Cáncer Cérvico-uterino. Guía para el diagnóstico y tratamiento de displasias y cáncer cérvico uterino. México: IMSS, 1998.
- Alonso P. Cambios citológicos por virus. En: Alonso P, Lazcano E, Hernández M, editors. *Cáncer cervico-uterino: diagnóstico, prevención y control*. 1ª ed. México: Médica Panamericana, 2000;pp:59-63.
- Viscidi RP. Epidemiología de las infecciones genitales por papilomavirus humano. En: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M, editores. *Colposcopia: principios y práctica*. 1ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2003;pp:1-23.
- Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, et al. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecologic Oncology* 1998;70:115-20.
- Wright OK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990;pp:18-19, 153-58.
- Peñaloza-Plascencia M, Montoya-Fuentes H, Flores-Martínez SE. Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otol Head Neck Surg* 2000;126:1119-23.
- Montoya-Fuentes H, de la Paz Ramírez-Muñoz M, Villar-Calvo V, Suárez-Rincón AE, et al. Identification of DNA sequences and viral proteins of 6 human papillomavirus types in retinoblastoma tissue. *Anticancer Res* 2003;23:2853-62.
- Tam LS, Chan AY, Chan PK. Chang arthritis reumatoide. Increased prevalence of squamous intraepithelial lesions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004;50:3619-25.
- Nind I, Zumbach K, Pawlita M, Teller K, et al. Absence of antibody against human papillomavirus type 16 E6 and E7 in patients with cervical cancer is independent of sequence variations. *J Infect Dis* 2000;181:1764-67.
- Hernández HD, García CA, Guido JM, González SJ, et al. High-risk human papilloma virus and cervical intraepithelial neoplasia in women at 2 hospitals in Mexico City. *Revista de Investigación Clínica* 2002;54:299-306.
- Giuliano AR, Papenfuss M, Mendez BE, Feng J, et al. Risk factors for squamous intraepithelial lesions of the cervix among women residing at the US-Mexico border. *Int J Cancer* 2004;109:112-8.
- Lazcano P, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-20.
- Cotton S, Sharp L, Seth R. What lifestyle factors are associated with high risk human papilloma virus (HPV) infection in women who have had abnormal cervical smears? Results from the Tombola trials. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:A17.

## Inseminación intrauterina *versus* coito programado en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada•

Juan Carlos Barros Delgadillo,\* Evaristo Martínez Barrios,\*\* Christian Moreno Aburto,\*\* Mirna Souraye Godines Enríquez,\*\*\* Félix Manzur Navarrete,\* Víctor Sánchez Solís,\* Gerardo Barroso Villa\*\*\*\*

Nivel de evidencia: II-2

### RESUMEN

**Antecedentes:** las técnicas de reproducción asistida se utilizan cada vez con mayor frecuencia en el tratamiento de parejas con diagnóstico de infertilidad.

**Objetivo:** analizar el valor de la inseminación intrauterina en pacientes a quienes se realiza hiperestimulación ovárica controlada.

**Material y métodos:** estudio analítico, comparativo, retrospectivo y longitudinal de casos y controles. Se analizaron los ciclos de inseminación intrauterina (grupo I) y de coito programado (grupo II) de pacientes a quienes se efectuó hiperestimulación ovárica controlada, del 1 enero del 2004 al 31 diciembre del 2006. Se incluyeron pacientes infértiles entre 24 y 42 años (grupo I) y entre 23 y 36 años de edad (grupo II). Se analizaron: edad, tipo, causa y tiempo de infertilidad, densidad y movilidad espermática poscapacitación, así como espermatobioscopia directa para coito programado; número de folículos totales y maduros, grosor endometrial, tipo y dosis de gonadotropina y día de inseminación para el grupo I o día de inicio del coito para el grupo II. Los resultados se analizaron con los programas STATA 7.0 y SPSS 12.0.

**Resultados:** se analizaron 873 ciclos en 539 pacientes del grupo I y 246 ciclos en 138 pacientes del grupo II. La tasa de embarazo por ciclo fue de 13.1% (inseminación intrauterina) y de 5.2% (coito programado,  $p > 0.05$ ). La edad promedio para inseminación intrauterina y coito programado fue de  $32.9 \pm 3.5$  y de  $31.82 \pm 2.7$  años, respectivamente. Hubo diferencia significativa sólo en la densidad espermática entre ambos grupos.

**Conclusiones:** la inseminación intrauterina no parece tener ventaja sobre el coito programado en las tasas de embarazo de pacientes que han recibido hiperestimulación ovárica controlada.

**Palabras clave:** inseminación intrauterina, coito programado, hiperestimulación ovárica controlada.

### ABSTRACT

**Background:** Assisted reproduction techniques are used more and more frequently in the treatment of couples with infertility diagnosis.

**Objective:** To analyze the intrauterine insemination (IUI) value in controlled ovarian hyperstimulation cycles (COH).

**Material and methods:** An analytic, comparative, retrospective and longitudinal case-control study was performed. COH with IUI (group I) or with timed intercourse (TI) (group II) cycles from January 1<sup>st</sup> 2004 to December 31<sup>st</sup> 2006 were analyzed. Infertile patients aged between 24 and 42 years (group I) and between 23 and 36 years (group II) were included. The following variables were analyzed: Age, type, etiology and duration of infertility, sperm density and motility after capacitation or seminal analysis, number of total and mature follicles, endometrial thickness, gonadotropin type and dosage, insemination or TI cycle day. Pregnant vs non pregnant and pregnancies in both groups were analyzed. Results were analyzed with the STATA 7.0 and SPSS 12.0 programs.

**Results:** 873 COH+IUI cycles in 539 couples and 246 COH+TI in 138 patients were analyzed the pregnancy rates per cycle were 13.1% and 5.2% for each group respectively. The mean woman's age was of  $32.9 \pm 3.5$  and  $31.8 \pm 2.7$  years for groups I and II respectively. There were significant differences in sperm density in both groups. The remaining variables showed no statistical differences.

**Conclusions:** IUI versus TI do not seem to be superior with respect to the pregnancy rates in COH cycles.

**Key words:** intrauterine insemination, controlled ovarian hyperstimulation, timed intercourse.

### RÉSUMÉ

**Antécédents :** les techniques de reproduction assistée s'emploient chaque fois de plus en plus dans le traitement de couples avec diagnostic d'infertilité.

**Objectif :** faire l'analyse de la valeur de l'insémination intra-utérine en patientes à qui on réalise hyperstimulation ovarienne contrôlée.

**Matériel et méthodes :** étude analytique, comparative, rétrospective et longitudinale de cas/contrôles. On a fait l'analyse des cycles d'insémination intra-utérine (groupe I) et de coït programmé (groupe II) de patientes à qui on a réalisé hyperstimulation ovarienne contrôlée, du 1<sup>er</sup> janvier 2004 au 31 décembre 2006. On a inclus des patientes infertiles d'entre 24 et 42 ans (groupe I) et d'entre 23 et 36 ans (groupe II).

II). On a fait l'analyse de : âge, type, cause et temps d'infertilité, densité et mobilité spermatique post capacitation, ainsi que EBD pour coït programmé ; nombre de follicules totaux et mûrs, épaisseur de l'endomètre, type et dose de gonadotrophine et jour de l'insémination pour le groupe I ou jour du début du coït pour le groupe II. Les résultats ont été analysés avec les programmes STATA 7.0 et SPSS 12.0.

Résultats : on a fait l'analyse de 873 cycles en 539 patientes du groupe I et 246 cycles en 138 patientes du groupe II. Le taux de grossesse par cycle a été de 13.1% (insémination intra-utérine) et de 5.2% (coït programmé) ( $p > 0.05$ ). La moyenne d'âge pour insémination intra-utérine et coït programmé a été de  $32.9 \pm 3.5$  et de  $31.82 \pm 2.7$  ans, respectivement. Il y a eu différence significative seulement dans la densité spermatique entre les deux groupes.

**Conclusions** : l'insémination intra-utérine ne semble pas avoir d'avantage sur le coït programmé dans les taux de grossesse de patientes qui ont reçu hyperstimulation ovarienne contrôlée.

**Mots-clés** : insémination intra-utérine, coït programmé, hyperstimulation ovarienne contrôlée.

## RESUMO

**Antecedentes**: As técnicas de reprodução assistida se utilizam com maior frequência no tratamento de casais com diagnóstico de infertilidade.

**Objetivo**: Analisar o valor da inseminação intrauterina em pacientes a quem se realiza hiperestimulação ovariano controlada.

**Material e métodos**: estudo analítico, comparativo, retrospectivo e longitudinal de casos e controles. Foi analisado ciclos de inseminação intrauterina (grupo I) e de coito programado (grupo II) de pacientes que se efetuaram hiperestimulação ovariano controlada, de 1 de janeiro de 2004 a 31 de dezembro de 2006. Incluíram pacientes inférteis entre 24 e 42 anos (grupo I) e entre 23 e 36 anos de idade (grupo II). Foi analisado: idade, tipo, causa, tempo de infertilidade, densidade, mobilidade de espermatozóide pós capacitação, assim como, EBD para coito programado; número de folículos totais e maduros, grossura endometrial, tipo e doses de ganadotropina e dia de inseminação para o grupo I ou dia de início do coito para o grupo II. Os resultados foram analisados com os programas STATA 7.0 e SPSS 12.0.

**Resultados**: Foram analisados 873 ciclos em 539 pacientes do grupo I e 246 ciclos em 138 pacientes do grupo II. A taxa de gravidez por ciclo foi de 13,1% (inseminação intrauterina) e de 5,2% (coito programado) ( $p > 0,05$ ). A idade média para a inseminação intrauterina e coito programado foi de  $32,9 \pm 3,5$  e de  $31,82 \pm 2,7$  anos, respectivamente. Houve uma diferença significativa somente na densidade espermática entre ambos grupos.

**Conclusões**: A inseminação intrauterina não parece ter vantagem sobre o coito programado em taxas de gravidez de pacientes que receberam hiperestimulação ovariano controlado.

**Palavras-chave**: inseminação intrauterina, coito programado, hiperestimulação ovariano controlado.

Las técnicas de reproducción asistida se aplican cada vez más como parte del tratamiento de parejas con diagnóstico de infertilidad. Estas técnicas aumentan las tasas de embarazo debido, entre otras cosas, al incremento del número de ovocitos

disponibles gracias a la acción de medicamentos que producen hiperestimulación ovárica, y a la realización de técnicas de capacitación espermática que aumentan la cantidad de espermatozoides funcionalmente competentes en el sitio de fertilización.

La estimulación ovárica con coito programado o en combinación con inseminación intrauterina se ha empleado para el tratamiento de la infertilidad en parejas con factor endocrino-ovárico alterado, infertilidad de causa no determinada y factor masculino alterado, entre otras.<sup>1</sup>

En la actualidad existen múltiples estudios que comparan las tasas de embarazo logradas con hiperestimulación ovárica controlada más inseminación intrauterina o con coito programado. Diferentes factores influyen en el resultado del tratamiento después de una estimulación ovárica con inseminación intrauterina o con coito programado.<sup>2,3</sup> Éstos incluyen: edad de la paciente, tiempo de infertilidad y factor alterado, protocolo de estimulación ovárica<sup>4,5</sup> y número de folículos preovulatorios disponibles, parámetros seminales, método utilizado para la preparación del

- Este trabajo obtuvo el tercer lugar del Premio Dr. José María Rodríguez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación clínica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007.
- \* Adscrito al Departamento de Reproducción Asistida.
- \*\* Residente del segundo año de Biología de la Reproducción Humana.
- \*\*\* Adscrito al Departamento de Toco-Cirugía.
- \*\*\*\* Subdirector de Área de Biología de la Reproducción Humana. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Juan Carlos Barros Delgadillo. Departamento de Reproducción Asistida. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, SS. E-mail: jcbarras@yahoo.com

Este artículo debe citarse como: Barros DJC, Martínez BE, Moreno AC y col. Inseminación intrauterina *versus* coito programado en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):18-31.

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

semen o capacitación espermática<sup>6,7</sup> y número de inseminaciones realizadas, entre otros.<sup>8,9</sup>

Un estudio multicéntrico de la Organización Mundial de la Salud demostró que la ovulación ocurre entre 24 y 56 horas posteriores a la detección de hormona luteinizante en suero y entre 8 y 40 horas después del pico de la misma.<sup>10</sup> La rotura folicular y la ovulación suelen ocurrir entre 36 y 48 horas después de la administración de hCG.<sup>11</sup>

En relación con lo anterior se encontró asociación entre administración de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) al final del protocolo de estimulación con una tasa de embarazo clínico más alta, independientemente del protocolo de hiperestimulación ovárica controlada utilizado y de la causa de la infertilidad.<sup>12</sup> También se ha demostrado mejor tasa de embarazo cuando se detecta el pico de LH al final del protocolo de estimulación utilizado.<sup>1</sup>

En relación con los factores pronósticos de éxito para embarazo con estos tratamientos, la edad de la paciente es de los más importantes porque la probabilidad se reduce en 9% por cada año después de los 30 años de edad. Así mismo, el tiempo de infertilidad parece ser importante porque algunos autores han encontrado que después de tres años de infertilidad, la posibilidad de embarazo disminuye en 1 a 2% por mes o hasta 25% por año.<sup>13</sup>

El tipo de medicamento utilizado en la hiperestimulación ovárica controlada parece ser también factor pronóstico. Martínez y su grupo<sup>14</sup> encontraron que el citrato de clomifeno en la estimulación ovárica en ciclos con o sin inseminación intrauterina no ofrece ventajas en las tasas de embarazo cuando se compara con ciclos espontáneos. En contraste, se observaron mayores tasas de embarazo cuando indicaron gonadotropinas para la hiperestimulación ovárica controlada, en mujeres normo-ovulatorias en combinación o no con inseminación intrauterina. Así mismo, otros autores<sup>15</sup> reportan tasas de embarazo del 19 *vs* 4% en ciclos de inseminación intrauterina y del 13 *vs* 17% en ciclos con coito programado cuando la estimulación ovárica fue con menotropinas *vs* citrato de clomifeno, respectivamente. Melis y col.<sup>16</sup> compararon el valor de la inseminación intrauterina con hiperestimulación ovárica controlada con citrato de clomifeno y FSH contra inseminación intrauterina con citrato de clo-

mifeno; sólo encontraron mayores tasas de embarazo en el primer grupo.

En cuanto al valor de los ciclos con hiperestimulación ovárica controlada únicamente o acompañada de inseminación intrauterina, un metanálisis reporta que la combinación de hiperestimulación ovárica controlada más inseminación intrauterina en parejas con infertilidad de causa no determinada produce mejores tasas de embarazo que la hiperestimulación ovárica controlada sola. Estos autores demostraron que la inseminación intrauterina con estimulación ovárica incrementa las tasas de embarazo entre 30 y 160%.<sup>17</sup> En relación con lo anterior, otros autores<sup>15</sup> reportan tasas generales de 12 y 13% en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada con inseminación intrauterina y coito programado, respectivamente, y concluyen que la inseminación intrauterina, como tal, no parece tener efectos benéficos en las tasas de embarazo sino, más bien, que la importancia radica en la hiperestimulación.

En cuanto al valor real de la hiperestimulación ovárica controlada o de la inseminación intrauterina como tal, de manera independiente o combinada, los autores no han llegado a conclusiones definitivas.<sup>11,15,18</sup>

El valor del procedimiento de inseminación intrauterina, *per se* (sin hiperestimulación ovárica controlada) parece radicar en que al utilizar semen capacitado, el depósito de grandes cantidades de espermatozoides activos dentro de la cavidad uterina aumenta las probabilidades de fertilización y embarazo; sin embargo, para lograrlo, ésta debe sincronizarse con la ovulación. Diversos autores, como Kemmann y col.,<sup>19</sup> toman como factor más importante para mejorar la tasa de embarazo al número de ovocitos disponibles mediante hiperestimulación ovárica controlada y no a la inseminación intrauterina *per se*. Mediante la estimulación ovárica se consigue no sólo ovulación múltiple sino, luego de un tiempo, incrementar la ventana de fertilización.

Con nuestro estudio pretendemos analizar, con tres años de experiencia, el valor de la inseminación intrauterina como tratamiento para la infertilidad en pacientes a quienes se efectúa hiperestimulación ovárica controlada. En los ciclos de hiperestimulación ovárica controlada, con y sin inseminación intrauterina, analizamos las variables pronósticas para embarazo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio analítico, comparativo, retrospectivo y longitudinal de casos y controles. Se analizaron 873 ciclos de hiperestimulación ovárica controlada e inseminación intrauterina homóloga (grupo de casos o grupo I) realizados en 539 pacientes y 246 ciclos de hiperestimulación ovárica controlada más coito programado (grupo control o II) realizado en 138 pacientes, entre el 1 de enero de 2004 y el 31 de diciembre de 2006.

Se incluyeron parejas con edades entre 23 y 42 años en el grupo de casos y entre 30 y 36 años en el grupo control, con infertilidad primaria o secundaria por factor endocrino-ovárico, tubo-peritoneal (con al menos una salpinge permeable), endometriosis mínima a severa, factor masculino alterado, factor uterino (miomatosis uterina no submucosa), factor mixto (más de un factor alterado) y con infertilidad de causa no determinada (infertilidad de causa no determinada).

A todas las pacientes se les realizó el siguiente protocolo de estudio antes de iniciar con el tratamiento propuesto: espermatobioscopia directa, determinación de concentraciones basales (días 3 a 5 del ciclo) de hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol (E2), prolactina (PRL), y pruebas de funcionamiento tiroideo, histerosalpingografía, laparoscopia diagnóstica o quirúrgica (sólo en el grupo de estudio), cultivos de exudado cérvico-vaginal, espermocultivo y cultivo de raspado uretral (para los varones) que incluyó determinación de *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* (en ambos).

Los pacientes con factor masculino alterado (según los parámetros de la OMS) se enviaron al departamento de andrología para su diagnóstico, seguimiento y tratamiento, servicio que indicó el tipo de inseminación a seguir (en un día, uno o doble eyaculado o doble día doble eyaculado) o si eran susceptibles de ser objeto de ciclos de coito programado.

### Definición de las variables

Se analizaron las siguientes variables: edad, tipo de infertilidad (primaria o secundaria), causa de la infertilidad (factor alterado), tiempo de infertilidad en años, densidad y movilidad espermática poscapacitación (en el caso de inseminación intrauterina),

número de folículos totales y maduros, grosor endometrial, dosis total de FSH utilizada en la estimulación ovárica, día del ciclo en el que se realizó la inseminación (en el grupo de casos) o en que se programó el coito (en el grupo control) y número del ciclo de inseminación o coito programado.

En la población de estudio se asignaron las siguientes definiciones operativas:

- Infertilidad primaria o secundaria: pareja que al momento de ingreso al estudio no había logrado el embarazo o lo había logrado, respectivamente.
- Causa de la infertilidad: factor alterado que pudiera explicar la infertilidad. Causa mixta cuando hubo más de un factor alterado en la pareja. La endometriosis se dividió en endometriosis I-II o III-IV de acuerdo con la clasificación de la *American Society for Reproductive Medicine*.
- Densidad espermática poscapacitación: concentración espermática después de la preparación del semen.
- Movilidad espermática: suma del porcentaje de movilidad A+B (movilidad lineal progresiva rápida más movilidad lineal progresiva lenta) según los parámetros de la OMS, siendo poscapacitación en el grupo de estudio y sin capacitación (tomado de la espermatobioscopia basal) en el grupo control que tuvo coito programado.
- Número de folículos totales y maduros: cantidad de folículos observados al final de la estimulación ovárica (se consideraron maduros cuando el tamaño del folículo fue mayor o igual a 16 mm).
- Grosor endometrial: longitud antero-posterior del endometrio medida a 1 cm del fondo de la cavidad endometrial con el útero en corte sagital expresada en milímetros.
- Dosis total de FSH: cantidad total de hormona folículo estimulante utilizada por la paciente al concluir la estimulación ovárica.
- Día de inseminación o coito programado: día del ciclo menstrual en el que se realizó la inseminación intrauterina o se programó el inicio de relaciones sexuales.
- Número del ciclo: cantidad de inseminaciones o ciclos de coito programado realizados a la paciente.
- Coito programado: momento a partir del cual se recomendó el inicio de relaciones sexuales, generalmente 24 horas después de la aplicación de hCG.

### Protocolo de estimulación ovárica y seguimiento folicular

La estimulación ovárica se inició, en la mayoría de las pacientes, con gonadotropina menopáusica humana (hMG), (Pergonal de Serono, Merapur HP de Ferring y Merional de IBSA) a dosis iniciales de 75 a 225 IU/día a partir del tercer día del ciclo. El seguimiento folicular se efectuó con un aparato de ultrasonido marca General Electric, Logic 5 Expert, (General Electric, Estados Unidos) con transductor endovaginal multifrecuencia de 6.0, 8.0 y 10.0 MHz. Se realizó ultrasonido endovaginal basal (entre los días 1 a 3 del ciclo) y, cuando no se encontró afectación ovárica, uterina o de las salpinges (miomas submucosos o que distorsionaran el contorno endometrial, quistes ováricos mayores de 12 mm, endometriomas o hidrosalpinx de cualquier diámetro que contraindicaran el inicio de la estimulación ovárica) se reinició el seguimiento folicular el día ocho del ciclo y se realizó cada 24 o 48 horas (dependiendo del tamaño folicular se aumentó o disminuyó la dosis de hMG en 37.5 a 75 UI/día), hasta encontrar en casos óptimos tres folículos mayores o iguales a 16 mm y no más de seis. En ese momento se decidió inducir la ovulación mediante la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) a dosis de 10,000 UI como dosis única. La inseminación intrauterina se realizó 36 horas después de administrar la hCG y, en los casos con indicaciones de inseminación en doble día, se realizaron a las 24 y 48 horas posteriores a la aplicación de esta hormona. En el caso de los ciclos de coito programado se recomendaron relaciones sexuales a partir de las 24 horas posteriores a la aplicación de hCG y durante seis días.

En algunas pacientes también se utilizó FSH recombinante (FSHr, Gonal F de Serono) a dosis similares a las de la hMG a la combinación de hMG, FSHr y citrato de clomifeno (100 mg/día) a partir del día 3 al 7 del ciclo (Omifin de Effik) o letrozole (Femara de Novartis) a dosis de 2.5 mg/día (del tercer al séptimo día del ciclo).

### Capacitación espermática

La muestra de semen se recolectó por masturbación (con abstinencia sexual de tres a seis días) en un recipiente de plástico estéril y se colocó en baño María a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente se realizó la espermatobioscopia precapacitación.

La preparación del semen o capacitación espermática se efectuó con la técnica de dos gradientes de concentración *Isolate upper-lower* (Irving Scientific) en uno de 40 y otro de 90%.

La muestra seminal se mezcló, volumen a volumen, con fluido tubárico humano (HTF) enriquecido con suero sintético sustituto (SSS) al 10% (HTF más SSS 10%); después se centrifugó durante cinco minutos a 1,600 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla o parte sólida del centrifugado con 2 mL de fluido tubárico humano y 10% de suero sintético sustituto.

Los gradientes de *Isolate* se colocaron en tubos de 15 mL (Falcon, Becton Dickinson, NJ) y en la parte cónica se depositaron: 1) 1 mL del gradiente menor o Lower (40%) y 1 mL del mayor o upper (90%) con cuidado de no mezclar los gradientes; y 2) la muestra resuspendida previamente se colocó encima de los dos gradientes en 2 mL de fluido tubárico humano y suero sintético sustituto al 10% y se centrifugó durante 12 minutos a 1,600 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 1 mL de fluido tubárico humano y suero sintético sustituto al 10% y se centrifugó durante cinco minutos a 1,600 rpm. Se eliminó de nuevo el sobrenadante y se ajustó a 0.5 mL. Se mezcló y se realizó la espermatobioscopia poscapacitación para obtener la muestra (lista para la inseminación).

### Técnica de inseminación

Con la paciente en posición de litotomía se colocó el espéculo vaginal y con gasas estériles secas se limpiaron el cuello y la vagina. Se conectó la jeringa de insulina de 1.0 mL (Becton Dickinson) al catéter de inseminación con guía (Laboratorios C.C.D.). Con el auxilio de una guía ultrasonográfica se introdujo lentamente hasta cerca de 1 cm del fondo uterino, se depositó la muestra en un minuto o menos y se extrajo el catéter lentamente. Se retiró el espéculo y la paciente permaneció en decúbito dorsal durante 30 minutos.

### Soporte de fase lútea

A todas las pacientes se les administró soporte de fase lútea con progesterona natural micronizada (Gestlutin, Asofarma; Utrogestan, Pfizer) a dosis de 200 mg cada 12 h desde el día siguiente a la inseminación hasta el

inicio de la menstruación y, en caso de haber embarazo, hasta la semana 10 de gestación.

### Análisis estadístico

La población se dividió en dos grupos: pacientes a quienes se realizó hiperestimulación ovárica controlada e inseminación intrauterina (grupo I o de estudio) y a quienes se efectuó hiperestimulación ovárica controlada con coito programado (grupo II o control). La variable independiente que se analizó fue la influencia de la inseminación intrauterina en las tasas de embarazo entre las pacientes a quienes se les realizó hiperestimulación ovárica controlada. También se analizaron las variables en cada grupo; para esto se dividió a las pacientes en embarazadas y no embarazadas y posteriormente se realizó el análisis final en el que se compararon los grupos en términos del comportamiento de las variables en las pacientes embarazadas del grupo I y II con el fin de analizar su influencia en la variable independiente de inseminación intrauterina.

El análisis estadístico se hizo con el programa STATA versión 7, SPSS versión 12; también se efectuó prueba de la *t* de Student, cuando se comprobaron supuestos. Cuando éstos no se cumplieron se utilizó la prueba de la *ji* al cuadrado.

### Estadística descriptiva

Las variables continuas (edad, tiempo de infertilidad en años, densidad espermática poscapacitación, movilidad espermática poscapacitación [A+B], folículos totales, folículos maduros, grosor endometrial, dosis total de FSH, día de inseminación y número de ciclo) se describieron con medidas de tendencia central de media, medidas de dispersión (DE) y rangos (mínimo y máximo).

Las variables categóricas (causa de la infertilidad, tipo de infertilidad y tratamiento) se describieron con frecuencias y porcentajes.

La variable de embarazo se utilizó como constante de agrupamiento para describir las mediciones de tendencia central, dispersión y frecuencias, divididas en los grupos de estudio y control.

### Estadística inferencial

En todos los casos se tomó como variable dependiente al embarazo, con valor de 1 para positivo (embarazo)

y 2 para negativo (no embarazo). Se consideró significativa la  $p < 0.05$ .

La variable del tipo de infertilidad se estimó en razón de probabilidades y su significado e intervalo de confianza con el método de Mantel-Haenszel. Las variables de causa de infertilidad y tratamiento se analizaron con la prueba de la *ji* al cuadrado independiente.

## RESULTADOS

Se analizaron los ciclos de hiperestimulación ovárica controlada e inseminación intrauterina (grupo I o de estudio) y de hiperestimulación ovárica controlada con coito programado (grupo II o control) realizados a todas las pacientes que acudieron del 1 de enero de 2004 al 31 de diciembre de 2006. Se recabaron los datos de 873 ciclos de inseminación intrauterina realizados en 539 pacientes y de 246 ciclos de coito programado efectuados a 138 pacientes en ese lapso.

La edad promedio de las pacientes de la población general (ambos grupos) fue de  $32.9 \pm 3.6$  años. El tiempo promedio de infertilidad fue de  $6.2 \pm 3.6$  años (cuadro 1). En ese cuadro también se anota la cantidad de folículos totales y maduros, las características seminales (poscapacitación para inseminación intrauterina y espermatobioscopia para coito programado) y el grosor endometrial.

En promedio, el día de inseminación o de programación del coito fue entre el 12 y 14 en 81.7% de las pacientes; el día 13 fue el más frecuente (31.9%). El tipo de infertilidad más recurrente fue la primaria

**Cuadro 1.** Características de la población general. Variables continuas

| <i>Variable</i>                  | <i>Frecuencia observada</i> |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Edad                             | $32.9 \pm 3.6$              |
| Tiempo de esterilidad            | $6.2 \pm 3.1$               |
| Dosis de FSH                     | $1169.1 \pm 309.0$          |
| Día de coito-día de inseminación | $13.0 \pm 1.1$              |
| Folículos totales                | $10.8 \pm 5.5$              |
| Folículos maduros                | $3.4 \pm 2.1$               |
| Densidad                         | $77.7 \pm 35.2$             |
| Movilidad                        | $69.9 \pm 18.9$             |
| Eco endometrial                  | $10.6 \pm 2.3$              |

Los valores se expresan en medias  $\pm$  desviación estándar.

con 70.6%. El tratamiento más utilizado fueron las menotropinas (hMG) en 82.1% (cuadro 2). Los factores más frecuentes de infertilidad en la población general fueron el mixto y el tubo-peritoneal con 59.5 y 11.5%, respectivamente.

**Cuadro 2.** Características de la población general. Variables categóricas

| <i>Variable</i>             | <i>Frecuencia observada (%)</i>                                                                                                                  |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tipo de infertilidad        | Primaria (70.6)<br>Secundaria (29.3)                                                                                                             |
| Día de inseminación o coito | Día 10 (0.8)<br>Día 11 (6.1)<br>Día 12 (26.8)<br>Día 13 (31.9)<br>Día 14 (23.0)<br>Día 15 (8.8)<br>Día 16 (1.9)<br>Día 17 (0.2)<br>Día 18 (0.08) |
| Tipo de tratamiento         | hMG (82.1)<br>CC/hMG (1.7)<br>FSHr (15.8)<br>hMG/FSHr (0.2)                                                                                      |

En el grupo de inseminación intrauterina, o grupo I, la edad promedio fue de  $33.1 \pm 3.5$  y de  $33.6 \pm 3.4$  años y el tiempo de infertilidad de  $5.6 \pm 2.6$  y  $6.7 \pm 3.2$  años en embarazadas y no embarazadas, respectivamente

( $p < 0.05$ ). Otro parámetro que resultó con diferencia significativa en este grupo fue la movilidad espermática poscapacitación, con  $80.4 \pm 11.6\%$  y de  $75.1 \pm 15.9\%$  en embarazadas y no embarazadas, respectivamente (cuadro 3). Así mismo, el tipo de infertilidad predominante en embarazadas y no embarazadas fue la primaria y el factor mixto el más frecuentemente alterado (cuadro 4).

En las pacientes con coito programado, o grupo II (embarazadas y no embarazadas), la variable estadísticamente significativa fue la cantidad total de folículos ( $12.6 \pm 5.4$  vs  $11.1 \pm 5.9$ ) y la movilidad espermática  $50.6 \pm 15.3\%$  vs  $49.7 \pm 14.1\%$ , respectivamente. Así mismo, el grosor endometrial alcanzó significado; en el grupo de embarazadas fue de  $9.9 \pm 1.6$  mm y de  $10.4 \pm 2.7$  mm para las no embarazadas ( $p < 0.05$ , cuadro 5).

En el grupo II la infertilidad primaria fue la predominante en embarazadas y no embarazadas y el factor alterado más frecuente en las pacientes embarazadas fue la infertilidad de causa no determinada (cuadro 6). En ambas, el protocolo de hiperestimulación ovárica controlada más utilizado fue con menotropinas (hMG). En las pacientes embarazadas del grupo de estudio y control la edad promedio fue de  $32.9 \pm 3.5$  y de  $31.8 \pm 2.7$  años y el tiempo de infertilidad de  $5.9 \pm 2.5$  y de  $3.5 \pm 2.1$  años, respectivamente, sin alcanzar diferencia significativa. Sólo la densidad y la movili-

**Cuadro 3.** Características de las pacientes embarazadas y no embarazadas a quienes se efectuó inseminación intrauterina (grupo I o de estudio). Variables continuas

| <i>Variables</i>       | <i>Frecuencias observadas</i> |                      |          |
|------------------------|-------------------------------|----------------------|----------|
|                        | <i>Embarazada</i>             | <i>No embarazada</i> | <i>p</i> |
| Edad                   | $33.1 \pm 3.5$                | $33.6 \pm 3.4$       | NS       |
| Tiempo de infertilidad | $5.6 \pm 2.6$                 | $6.75 \pm 3.2$       | $< 0.05$ |
| Dosis de FSH           | $1181.5 \pm 297.5$            | $1197 \pm 298.5$     | NS       |
| Día de inseminación    | $13.0 \pm 1.1$                | $13.1 \pm 1.1$       | $< 0.05$ |
| Folículos totales      | $11.0 \pm 5.7$                | $10.6 \pm 5.3$       | NS       |
| Folículos maduros      | $3.2 \pm 1.4$                 | $3.1 \pm 1.4$        | NS       |
| Densidad               | $88.0 \pm 36.6$               | $77.5 \pm 34.6$      | NS       |
| Movilidad              | $80.4 \pm 11.6$               | $75.1 \pm 15.9$      | $< 0.05$ |
| Eco endometrial        | $10.8 \pm 2.2$                | $10.6 \pm 2.3$       | NS       |

Los valores se expresan en medias  $\pm$  desviación estándar.

**Cuadro 4.** Características de las pacientes embarazadas y no embarazadas objeto de inseminación intrauterina (grupo I o de estudio). Variables categóricas

| Variable                             | Frecuencia observada             |                                  |    |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----|
|                                      | Embarazada (%)                   | No embarazada (%)                | p  |
| Tipo de esterilidad                  | Primaria 60.8<br>Secundaria 39.1 | Primaria 70.4<br>Secundaria 29.5 | NS |
| Factor causa de esterilidad          |                                  |                                  |    |
| Masculino                            | 0                                | 3.0                              | NS |
| Endocrino-ovárico                    | 11.3                             | 4.4                              |    |
| Infertilidad de causa no determinada | 6.9                              | 2.3                              |    |
| Tubo-peritoneal                      | 4.3                              | 3.0                              |    |
| Endometriosis I-II                   | 9.5                              | 8.1                              |    |
| Endometriosis III-IV                 | 1.7                              | 2.5                              |    |
| Uterino                              | 6.0                              | 4.0                              |    |
| Mixto                                | 60                               | 2.2                              |    |

dad espermática alcanzaron diferencias significativas:  $85.7 \pm 35.8$  vs  $96.6 \pm 24.7$  millones/mL y de  $80.6 \pm 50.6$  y  $50.6 \pm 15.3\%$  en el grupo I y II, respectivamente ( $p < 0.05$ ). El número de folículos maduros fue de  $3.7 \pm 2.2$  en el grupo I y de  $3.3 \pm 1.3$  en el grupo II ( $p > 0.05$ , cuadro 7).

En cuanto al factor alterado, en el grupo I la tasa de embarazo más alta se logró en las pacientes con

infertilidad de causa no determinada, seguida de las pacientes con factor endocrino-ovárico con 30.7 y 27.6%, respectivamente; mientras que en el grupo II las mejores tasas de embarazo se lograron en las pacientes con endometriosis I-II (25%) seguidas de las pacientes con factor endocrino-ovárico e infertilidad de causa no determinada, con 5% de embarazadas cada uno, respectivamente (cuadros 8 y 9).

Por lo que se refiere a las pacientes embarazadas en los grupos I y II, el tratamiento de hiperestimulación ovárica controlada con citrato de clomifeno y menotropinas fue el que tuvo la tasa más alta de embarazo con 100% (sólo dos pacientes llevaron este protocolo de tratamiento), seguido de hiperestimulación ovárica controlada con FSHr con 15.1%. En el grupo II las tasas más altas se lograron con menotropinas y FSHr con 5.9 y 4.7%, respectivamente (cuadros 10 y 11).

Por último, las tasas de embarazo para los grupos I y II fueron de 13.1 y 5.2%, respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas ( $p > 0.05$ , cuadro 12).

## DISCUSIÓN

La finalidad de este estudio fue comparar a dos grupos de pacientes que con el propósito de lograr el embarazo recibieron hiperestimulación ovárica controlada y que tenían, como variable diferente, coito programado o inseminación intrauterina. De acuerdo

**Cuadro 5.** Características de las pacientes embarazadas y no embarazadas con coito programado (grupo II o control). Variables continuas

| Variables              | Frecuencia         |                    |          |
|------------------------|--------------------|--------------------|----------|
|                        | Embarazada         | No embarazada      | p        |
| Edad                   | $31.8 \pm 2.7$     | $30.3 \pm 3.8$     | NS       |
| Tiempo de esterilidad  | $3.5 \pm 2.1$      | $4.5 \pm 2.2$      | NS       |
| Dosis de FSH           | $1111.5 \pm 306.6$ | $1071.2 \pm 338.2$ | NS       |
| Día de inicio de coito | $12.6 \pm 0.7$     | $13.1 \pm 1.2$     | NS       |
| Folículos totales      | $12.6 \pm 5.4$     | $11.1 \pm 5.9$     | $< 0.05$ |
| Folículos maduros      | $3.3 \pm 1.3$      | $2.7 \pm 1.4$      | NS       |
| Densidad               | $96.6 \pm 24.7$    | $82.9 \pm 33.3$    | NS       |
| Movilidad              | $50.6 \pm 15.3$    | $49.7 \pm 14.1$    | $< 0.05$ |
| Eco endometrial        | $9.9 \pm 1.6$      | $10.4 \pm 2.7$     | $< 0.05$ |

Los valores se expresan en medias  $\pm$  desviación estándar.

**Cuadro 6.** Características de las pacientes embarazadas y no embarazadas con coito programado (grupo II o control). Variables categóricas

| Variables                            | Frecuencia observada              |                                  | p  |
|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----|
|                                      | Embarazada (%)                    | No embarazada (%)                |    |
| Tipo de esterilidad                  | Primaria 65.3<br>Secundaria: 34.7 | Primaria 69.1<br>Secundaria 30.9 | NS |
| Factor causa de esterilidad          |                                   |                                  |    |
| Masculino                            | 0                                 | 0                                |    |
| Endocrino-ovárico                    | 10.2                              | 10.4                             |    |
| Infertilidad de causa no determinada | 24.4                              | 5.7                              |    |
| Tubo-peritoneal                      | 17.3                              | 4.6                              |    |
| Endometriosis I-II                   | 17.5                              | 8.4                              | NS |
| Endometriosis III-IV                 | 0                                 | 1.8                              |    |
| Uterino                              | 0                                 | 3.9                              |    |
| Mixto                                | 23.1                              | 65.4                             |    |

con esto y con el fin de estudiar el impacto o valor del procedimiento de inseminación intrauterina como tal (variable independiente), se analizaron las variables descritas en la población general, en las pacientes embarazadas y no embarazadas de ambos grupos por separado y, por último, en la población principal y objeto del estudio, como las pacientes embarazadas de los grupos de estudio y control.

Está demostrado que la edad de la mujer se relaciona de manera directa con la fecundidad, la cual disminuye con el paso de los años y es una de las causas más probables de disminución de la calidad ovocitaria.<sup>20</sup> Campana y su grupo<sup>21</sup> reportan que las tasas de embarazo por ciclo y por paciente disminuyen después de los 39 años, aunque sólo encontraron diferencias significativas en las tasas de embarazo por ciclo, del orden del 7% en promedio contra 2.5% en

pacientes menores y mayores de 39 años, respectivamente. Mathieu y sus colaboradores<sup>22</sup> reportaron que las pacientes con edad menor a 30 años tienen mayor probabilidad de lograr un embarazo en comparación con las mayores de 35 años; sin embargo, los autores no encuentran diferencias estadísticas en las tasas de embarazo entre los grupos. Zeyneloglu y col.<sup>13</sup> mencionan una disminución en la tasa de embarazo de 9% por año después de los 30 años de edad y Dickey y su grupo<sup>17</sup> señalan una tasa de embarazo por ciclo de 12.7 y de 5.8% para pacientes menores y mayores de 35 años, respectivamente. Así mismo, estos autores encuentran una relación entre edad y cantidad de folículos con la tasa de embarazo, lo que demuestra que con cuatro o mas folículos  $\geq 12$  mm, la tasa de embarazo en menores de 35 años fue de 25.8% y del 14% para pacientes mayores de 35 años. En nuestro estudio no se

**Cuadro 7.** Características de las pacientes embarazadas a quienes se efectuó inseminación intrauterina y coito programado

| Variables                        | Frecuencias observadas |                |       |
|----------------------------------|------------------------|----------------|-------|
|                                  | Embarazadas            |                |       |
|                                  | Coito                  | IAH            | p     |
| Edad                             | 31.8 ± 2.7             | 32.9 ± 3.5     | NS    |
| Tiempo de esterilidad            | 3.5 ± 2.1              | 5.9 ± 2.5      | NS    |
| Dosis de FSH                     | 1111.5 ± 306.6         | 1289.3 ± 108.5 | NS    |
| Día de coito/día de inseminación | 12.6 ± 0.7             | 13.0 ± 1.1     | NS    |
| Folículos totales                | 12.6 ± 5.4             | 11.2 ± 5.8     | NS    |
| Folículos maduros                | 3.3 ± 1.3              | 3.7 ± 2.2      | NS    |
| Densidad                         | 96.6 ± 24.7            | 85.7 ± 35.8    | <0.05 |
| Movilidad                        | 50.6 ± 15.3            | 80.6 ± 11.3    | <0.05 |
| Eco endometrial                  | 9.9 ± 1.6              | 10.8 ± 2.2     | NS    |

Los valores se expresan en medias  $\pm$  desviación estándar.

**Cuadro 8.** Tasa de embarazo por ciclo y por factor en pacientes a quienes se efectúa inseminación intrauterina

| <i>Factor</i>                        | <i>Ciclos</i> | <i>Embarazos</i> | <i>Tasa (%)</i> |
|--------------------------------------|---------------|------------------|-----------------|
| Masculino                            | 23            | 0                | 0               |
| Endocrino                            | 47            | 13               | 27.6            |
| Infertilidad de causa no determinada | 26            | 8                | 30.7            |
| Tubo-peritoneal                      | 28            | 5                | 17.8            |
| Endometriosis I-II                   | 73            | 11               | 15              |
| Endometriosis III-IV                 | 21            | 2                | 9.5             |
| Uterino                              | 38            | 7                | 18.4            |
| Mixto                                | 617           | 69               | 11.1            |

**Cuadro 9.** Tasa de embarazo por ciclo y por factor en pacientes objeto de coito programado

| <i>Factor</i>                        | <i>Ciclos</i> | <i>Embarazos</i> | <i>Tasa (%)</i> |
|--------------------------------------|---------------|------------------|-----------------|
| Masculino                            | 6             | 0                | 0               |
| Endocrino                            | 130           | 7                | 5               |
| Infertilidad de causa no determinada | 20            | 1                | 5               |
| Tubo-peritoneal                      | 30            | 1                | 3               |
| Endometriosis I-II                   | 8             | 2                | 25              |
| Endometriosis III-IV                 | 0             | 0                | 0               |
| Uterino                              | 12            | 0                | 0               |
| Mixto                                | 41            | 2                | 4               |

encontraron diferencias significativas en la edad entre pacientes embarazadas y no embarazadas en cada grupo estudiado ni tampoco al momento de comparar a las pacientes embarazadas de los grupos I y II.

En cuanto al tiempo de infertilidad, éste fue mayor en las pacientes embarazadas *vs* no embarazadas del grupo I (5.6 *vs* 6.7 años), respectivamente ( $p < 0.05$ ); sin el mismo significado entre las pacientes del grupo II. Al momento de comparar a las pacientes embarazadas de ambos grupos tampoco se encontró diferencia significativa, a pesar de que ésta fue de 5.9 *vs* 3.5 años entre el grupo de estudio y el control. Barros y su grupo<sup>23</sup> reportan diferencias significativas en el tiempo de infertilidad entre las pacientes embarazadas objeto de inseminación intrauterina, en quienes informan tasas de embarazo de 17.6 *vs* 9.2% cuando tenían entre 1 a 3 *vs* 10 a 12 años de infertilidad, respectivamente; la tasa fue del cero por ciento después de 13 años de infertilidad. Así mismo, al realizar regresión logística, encontraron un punto de corte de 4.5 años como el

tiempo por encima y por debajo del cual óptimamente se consiguen embarazos, de acuerdo con lo reportado por otros autores.<sup>24</sup> En contraste, Dodson y col.<sup>11</sup> no encuentran una asociación significativa del éxito de embarazo con la duración de la infertilidad en pacientes bajo inseminación homóloga, ya que reportan que en pacientes con infertilidad de 1 a 2 años, la fecundidad por ciclo fue de 0.16, en infertilidad de 3 a 5 años de 0.15 y en pacientes con más de cinco años de 0.13.

Es difícil determinar y aislar el efecto negativo de la causa de infertilidad en la tasa de embarazo. En nuestro estudio se encontró que para el grupo I (hiperestimulación ovárica controlada e inseminación intrauterina) la mejor tasa de embarazo por ciclo se obtuvo en la infertilidad de causa no determinada (30.7%) seguida por las pacientes con factor endocrino-ovárico (27.6%), aunque la causa más frecuente de infertilidad fue el factor mixto en embarazadas y no embarazadas (cuadro 8). En el grupo II (hiperestimulación ovárica controlada y coito programado) la mejor tasa de embarazo se obtuvo en pacientes con endometriosis grados I-II (25%) seguido por el factor endocrino-ovárico y de causa no determinada, ambos con 5% (cuadro 9). En relación con lo anterior, algunos autores<sup>25</sup> también señalan a la infertilidad de causa no determinada seguida del factor endocrino-ovárico como las causas de infertilidad más relacionadas con embarazo en inseminación intrauterina. Otras investigaciones<sup>11,18,26</sup> reportan tasas de embarazo de 8.7, 19 y 26.4% en pacientes con infertilidad de causa no determinada a quienes se les realizó inseminación intrauterina.

Martínez y col.<sup>27</sup> mencionan que el factor mixto lo padece un tercio de la población infértil y encuentran tasas de embarazo de 8.7 *vs* 4.3% en pacientes con inseminación intrauterina *vs* coito programado con

**Cuadro 10.** Tasa de embarazo por ciclo y por tratamiento en pacientes a quienes se realizó inseminación intrauterina

| <i>Medicamento</i> | <i>Ciclo</i> | <i>Embarazo</i> | <i>Tasa (%)</i> |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| hMG                | 710          | 89              | 12.5            |
| CC/hMG             | 2            | 2               | 100             |
| FSHr               | 152          | 23              | 15.1            |
| hMG/FSHr           | 8            | 1               | 12.5            |
| Letrozole          | 0            | 0               | 0               |

**Cuadro 11.** Tasa de embarazo por ciclo y por tratamiento en pacientes a quienes se efectuó coito programado

| Medicamento | Ciclo | Embarazo | Tasa (%) |
|-------------|-------|----------|----------|
| hMG         | 202   | 12       | 5.9      |
| CC/hMG      | 20    | 0        | 0        |
| FSHr        | 21    | 1        | 4.7      |
| hMG/FRS     | 2     | 0        | 0        |
| Letrozole   | 0     | 0        | 0        |

**Cuadro 12.** Tasas de embarazo en inseminación intrauterina y coito programado

|             | Inseminación | Coito | p    |
|-------------|--------------|-------|------|
| Embarazo    | 115          | 13    | NS   |
| No embarazo | 758          | 233   | NS   |
| Ciclos      | 873          | 246   | 1119 |
| Pacientes   | 539          | 138   | 677  |
| Porcentaje  | 13.1         | 5.2   | NS   |

infertilidad de causa no determinada, respectivamente.

La concentración y movilidad espermática poscapacitación son, al parecer, los factores predictivos más importantes para lograr el embarazo en pacientes sometidas a inseminación intrauterina, aunque se han propuesto otros parámetros seminales, como la morfología.<sup>6</sup> Existen varios reportes, como el de Campana y col.,<sup>21</sup> que lograron que la tasa de embarazo con inseminación intrauterina fuera de 7.1% en pacientes con cuentas espermáticas poscapacitación de 1 a 5 millones/mL, lo cual coincide con Dickey y su grupo<sup>17</sup> que consiguieron una tasa de embarazo del 12.5% con cuentas espermáticas precapacitación  $\geq 5$  millones/mL y del 7.1 % con cuentas menores. Así mismo, señalan que con cuentas espermáticas poscapacitación mayores de 5 millones/mL no se incrementa la tasa de embarazo y que cuando la movilidad espermática precapacitación fue menor de 30% no se consiguieron embarazos, según Urry y sus colaboradores.<sup>28</sup> Ransom y su grupo<sup>8</sup> mencionan que, por lo menos, se requiere una cuenta espermática de un millón de espermatozoides móviles poscapacitación en una inseminación para lograr un embarazo, en coincidencia con otros autores.<sup>29,30</sup> En este estudio se evaluó el valor de la densidad y movilidad espermática poscapacitación, así como de los valores de densidad y movilidad (A+B) de la es-

permatobioscopia en el grupo II (coito programado), como los principales parámetros seminales pronósticos de éxito. En el grupo I se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides móviles poscapacitación, que fueron de  $80.4 \pm 11.6$  y de  $75.1 \pm 15.9\%$ , respectivamente, en embarazadas y no embarazadas ( $p = < 0.05$ ). Igual sucedió en el grupo II.

Al momento de analizar a las pacientes embarazadas en ambos grupos, se encontraron diferencias significativas entre ellos en lo que se refiere a densidad y movilidad espermática (cuadro 7). El significado clínico de estos hallazgos debe interpretarse con precaución puesto que los valores encontrados en ambos grupos sobrepasan, con mucho, los valores mínimos normales de la OMS.<sup>31</sup> Además, estos valores en el grupo II son los de la espermatobioscopia.

La cantidad de folículos totales y maduros también parece ser un factor pronóstico de éxito para inseminación intrauterina y para coito programado. Dickey y col.<sup>17</sup> mencionan que los porcentajes de embarazo aumentan cuando existen múltiples folículos al momento de la aplicación de la hCG; sin embargo, no señalan ni el número ni el tamaño ideal. Son pocos los estudios que relacionan la cantidad total de folículos (al final de la estimulación ovárica) con el éxito de inseminación<sup>23</sup> o coito programado. En nuestro estudio sólo encontramos diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el número total de folículos entre las pacientes embarazadas y no embarazadas del grupo II. No así para el número de folículos maduros en ninguno de los grupos.

El estudio publicado por Khalil y col.<sup>25</sup> que valora los factores pronósticos en 2,473 ciclos de inseminación intrauterina señala que las tasas de embarazo fueron significativamente más altas dependiendo del número de folículos maduros, con mejores resultados cuando hubo entre tres y cuatro. En nuestros dos grupos de estudio, a pesar de que no hubo diferencia significativa en el número de folículos maduros, se encontró una tendencia a mayor desarrollo en el grupo de coito programado (3.12:1.4) en comparación con el grupo de inseminación intrauterina (2.92:1.8).

En cuanto al grosor o eco endometrial, sólo se encontró diferencia significativa entre las pacientes embarazadas y no embarazadas del grupo II, fue mayor en las últimas, lo cual quizá pueda interpretarse

a la luz de que a pesar de ser menor en las embarazadas, en ambos grupos el grosor fue mayor de 8 mm. Algunos de los autores<sup>25</sup> que no reportan diferencias significativas encuentran, con un grosor  $\geq 6$  mm, una tasa de embarazo de 14.2 *vs* 13.0% con menos de 6 mm. Otros autores<sup>32</sup> señalan que ni el grosor del endometrio ni el patrón de ecogenicidad en el día 10 se correlacionan con el resultado del tratamiento en cuanto a embarazo se refiere.

Existen varios reportes que apoyan a las menotropinas (hMG) como protocolo de estimulación ideal para coito programado y para inseminación intrauterina.<sup>13,16,27</sup> En nuestras pacientes las menotropinas fueron el tratamiento que se utilizó con más frecuencia en ambos grupos; sin embargo, en el grupo I el tratamiento con mayor tasa de embarazo por ciclo fue el CC/hMG (100%), seguido por FSHr (15.1%) (cuadro 10), mientras que para el grupo de coito programado fue hMG (5.9%) seguido por FSHr (4.7%, cuadro 11).

En relación con lo anterior, Hughes y su grupo<sup>3</sup> realizaron un metanálisis de 5,214 ciclos para conocer la efectividad de la inducción de la ovulación con FSH, CC y sin estimulación en ciclos con inseminación intrauterina y coito programado, reportaron tasas de 15, 7 y 6%, respectivamente, con inseminación intrauterina y de 7, 9 y 2%, respectivamente, con coito programado.

El momento del ciclo en que se realiza la inseminación o se programa el inicio del coito es otro factor muy importante para el éxito, según diferentes autores,<sup>30,33</sup> quienes relacionan una fase folicular corta con disminución en el porcentaje de embarazos. Así mismo, Check y su grupo<sup>30</sup> encontraron tasas de embarazo de 7.8 y 16.1% cuando la inseminación se realizó antes del día 13 del ciclo y entre el día 13 y 16, respectivamente. En nuestros resultados no se encontraron diferencias significativas al respecto entre el grupo de estudio y el control.

Por último, en cuanto a la efectividad de la inseminación intrauterina como tal sobre el coito programado, algunos autores<sup>34</sup> encuentran en pacientes sometidas a hiperestimulación ovárica controlada, tasas de embarazo con inseminación intrauterina y con coito programado del 10% en cada grupo en parejas con factor masculino levemente alterado y en aquellas con infertilidad de causa no determinada

tasas de 18% en cada uno de los grupos sin alcanzar diferencias significativas. Así mismo, Zikopoulos y col.<sup>35</sup> encontraron tasas de embarazo del 15 *vs* 11% en pacientes a quienes se hizo inseminación intrauterina *vs* coito programado ( $p>0.05$ ). De acuerdo con esto, nuestros resultados no alcanzan significado estadístico entre las tasas de embarazo de los grupos I y II; sin embargo, es necesario resaltar que si bien es cierto no se demostró diferencia entre los grupos, la inseminación intrauterina logró una tasa de embarazo considerablemente mejor que el grupo de coito programado (13.1 *vs* 5.2%). Lo anterior se ve, asimismo, apoyado por el estudio de Martínez y col.,<sup>26</sup> quienes reportan tasas de 7.5 y 5.4% en inseminación intrauterina y coito programado, respectivamente ( $p>0.05$ ). Karlstrom y su grupo<sup>15</sup> comunicaron tasas de embarazo para inseminación intrauterina y coito programado de 12 y 13%, respectivamente ( $p>0.05$ ).

En la bibliografía existen reportes que apoyan a la inseminación intrauterina como el factor determinante para mejorar las tasas de embarazo mientras que otros concluyen que es la hiperestimulación con gonadotropinas (hiperestimulación ovárica controlada), el punto relevante para mejorarlas.<sup>11,15,18</sup> En una revisión sistemática de la base de datos Cochrane se concluye que la inseminación intrauterina no tiene valor significativo sobre el coito programado en las pacientes con factor cervical.<sup>36</sup> Zeyneloglu y col.,<sup>13</sup> en su metanálisis, reportan que la adición de la inseminación intrauterina a la hiperestimulación ovárica controlada en pacientes con infertilidad de causa no determinada produce mejores resultados que el coito programado; y aunque cinco de los siete estudios incluidos en su metanálisis no lograron mostrar diferencia significativa, la evaluación general reveló un incremento significativo límite en las tasas de embarazo en las pacientes objeto de hiperestimulación ovárica controlada e inseminación intrauterina (RM 1.52 95% IC 0.98-2.37), concluyeron que la inseminación intrauterina agregada a la hiperestimulación ovárica controlada incrementa la probabilidad de embarazo de 30 a 160%.

Para terminar, es necesario resaltar que nuestra investigación se realizó en una población infértil abierta; esto es, se efectuó el análisis de todos los ciclos efectuados en los últimos tres años, indepen-

dientemente de la edad, tipo y tiempo de infertilidad y factor alterado, que son de considerable peso pronóstico en la consecución del embarazo. Así mismo, para la interpretación de los resultados vale la pena anotar que, de acuerdo con el protocolo de estudio de la pareja infértil en la institución, las mujeres enviadas para inseminación intrauterina deben tener una laparoscopia pero no las referidas para coito programado; esto podría explicar, en parte, las diferencias en las tasas de embarazo logradas, partiendo del hecho de que algún problema tubario o de endometriosis no se hubiera diagnosticado antes de pasar al tratamiento.

## CONCLUSIONES

Todos los médicos tratantes de parejas infértiles tenemos la obligación de ofrecerles el mejor método para lograr el embarazo. Es menester considerar que para que se dé el éxito en cada una de las técnicas, son muchos los factores que influyen para lograr resultados en cada una de ellas. De lo anterior se puede concluir que, a pesar del número de ciclos analizados, no existe superioridad de la inseminación intrauterina sobre el coito programado en las pacientes sometidas a hiperestimulación ovárica controlada, y que quizá sean las ventajas de esta última las que representan la piedra angular en el éxito del tratamiento.

Quizá sea necesario ampliar la población de estudio o controlar algunas variables para establecer la superioridad o no de la inseminación intrauterina en relación con el coito programado.

## REFERENCIAS

- Allen NC, Herbert CM, Mason WS, Rogers BJ, Diamond MP, Wentz AC. Intrauterine insemination a critical review. *Fertil Steril* 1985;44:569-80.
- Cohlen BJ, te Velde ER, van Kooij RJ, Looman CW, Habbeema JD. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treating male sub-fertility: a controlled study. *Hum Reprod* 1993;13:1553-8.
- Hughes EG. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Hum Reprod* 1997;12:1865-72.
- Mitwally M, Abdel-Razeq S, Casper R. Human chorionic gonadotropin administration is associated with high pregnancy rates during ovarian stimulation and timed intercourse of intrauterine insemination. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:1-8.
- Dickey RP, Olar TT, Taylor SN, Curole ON, et al. Relationship of follicle number, serum estradiol, and other factors to birth rate and multiparity in human menopausal gonadotropin induced intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril* 1991;56:89-92.
- Burr RW, Sieberg R, Flaherty SP, Wang XJ, Mathews CD. The influence of sperm morphology and the number of motile sperm inseminated on the outcome of intrauterine insemination combined with mild ovarian stimulation. *Fertil Steril* 1996;65:127-32.
- Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1985;43:268-73.
- Ransom MX, Bohrer M, Kemmann I, Blotner MB, Carsan BE. Does of intrauterine insemination improve pregnancy rates significantly during superovulation cycles? *Fertil Steril* 1994;61:303-7.
- Khalifa Y, Redgment CJ, Tsigotis M, Grudzinskas JG, Craft IL. The value of single versus repeated insemination in intrauterine donor insemination cycles. *Hum Reprod* 1995;10:153-4.
- Collins JA, Crosignani PG. Unexplained infertility: a review of diagnosis, prognosis, treatment efficacy and management. *Int J Gynaecol Obstet* 1992;39:267-75.
- Dodson WC, Haney AF. Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of infertility. *Fertil Steril* 1991;55:457-67.
- Testart J, Frydman R. Minimum time lapse between luteinizing hormone surge of human chorionic gonadotropin administration and follicular rupture. *Fertil Steril* 1982; 37:50-53.
- Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL, Duleba AJ. Comparison of intrauterine insemination with timed intercourse in superovulated cycles with gonadotropins: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1998;69:486-91.
- Martinez AR, Bernardus RE, Voorhorst FJ, Vermeiden JP, Schoemaker J. Intrauterine insemination does and clomiphene citrate does not improve fecundity in couples with infertility due to male or idiopathic factors: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 1990;53:847-53.
- Karlstrom PO, Bergh T, Lundkvist O. A prospective randomized trial of artificial insemination versus intercourse in cycles stimulated with human menopausal gonadotropin or clomiphene citrate. *Fertil Steril* 1993;59:554-9.
- Melis GB, Paoletti AM, Strigini F, Fabris FM, Canale O, Fioretti P. Pharmacologic induction of multiple follicular development improves the success rate of artificial insemination with husband's semen in couples with male related or unexplained infertility. *Fertil Steril* 1987;47:441-5.
- Dickey RP, Alar TT, Taylor SN, Curole ON, Rye PH. Relationship of follicle number and other factors to fecundability and multiple pregnancy in clomiphene citrate-induced intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril* 1992;57:613-9.
- Serbal PF, Katz M, Little V, Woronowski H. Unexplained infertility the value of pergonal superovulation combined with intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1988;49:602-6.
- Kemmann E, Bohrer M, Shelden R, Fiasconaro G, Beardsley L. Active ovulation management increases the monthly probability of pregnancy occurrence in ovulatory women who receive intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1987;48:916-20.
- Navot O, Bergh PA, William MA. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age related decline in

- female fertility. *Lancet* 1991;337:1375-7.
21. Campana A, Sakkas O, Stalberg A, Bianchi PG, et al. Intrauterine insemination evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod* 1996;11:732-6.
  22. Mathieu C, Ecochard R, Bied V. Cumulative conception rate following intrauterine artificial insemination with husband's age. *Hum Reprod* 1995;10:1090-7.
  23. Barros JC, Rojas JC, Molina AC, Villalobos S, y col. Factores pronósticos de embarazo en inseminación intrauterina. *Ginecol Obstet Mex* 2006;74:611-25.
  24. Kossoy LR, Hill GA, Parker RA. Luteinizing hormone and ovulation timing in a therapeutic donor insemination program using frozen semen. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:980-9.
  25. Khalil RM, Emil RP, Karin E, Broch LS, et al. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Scand Soc Obstet Gynecol* 1998;80:74-81.
  26. Martinez AR, Bernardus RE, Voorhorst FJ, Vermeiden JPW, Schoemaker J. Pregnancy rates after timed intercourse or intrauterine insemination after human menopausal gonadotropin stimulation of normal ovulatory cycles: a controlled study. *Fertil Steril* 1991;55:258-65.
  27. Martinez AR, Bernardus RE, Vermeiden JPW. Factors affecting pregnancy results after intrauterine insemination. *Hum Reprod* 1988;35-42.
  28. Urry RL, Middleton RG, McGavin S. A simple and effective technique for increasing pregnancy rates in couples with retrograde ejaculation. *Fertil Steril* 1986;46:1124-8.
  29. Cruz RI, Kemmann E, Brandeis BT. A prospective study of intrauterine insemination of processed sperm from men with oligoasthenospermia in superovulated women. *Fertil Steril* 1986;46:673-8.
  30. Check JH, Adelson H, Lurie O, Jamison T. Effect of the short follicular phase on subsequent conception. *Gynecol Obstet Invest* 1992;34:180-3.
  31. Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 4ª ed. México: OMS-Médica Panamericana, 2002.
  32. Biljan MM, Mahutte NG, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized double-blind trial of the correlation between time of administration and antiestrogenic effects of clomiphene citrate on reproductive end organs. *Fertil Steril* 1999;71:633-8.
  33. Stanger JD, Yovich JL. Reduced *in vitro* fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:385-93.
  34. Melis GB, Paoletti AM, Ajossa S, Guerriero S. Ovulation induction with gonadotropins as sole treatment in infertile couples with open tubes: a randomized prospective comparison between intrauterine insemination and timed vaginal intercourse. *Fertil Steril* 1995;64:1088-93.
  35. Zikopoulos K, West CP, Thong PW, Kaeser EM, et al. Homologous intra-uterine insemination has no advantage over timed natural intercourse when used in combination with ovulation induction for the treatment of unexplained infertility. *Hum Reprod* 1993;8:563-7.
  36. Helmerhorst FM, Van Vliet HAAM, Gornas T, Finken MJJ, Grimes DA. Intrauterine insemination vs timed intercourse for cervical hostility in subfertile couples (review). *Cochrane data base of systematic reviews* 2005; Issue 4. Art. No.: CD002809. 001: 10.1002/14651858. CD002909.pub2.

Sociedad Internacional de Menopausia

**12 Congreso Mundial de Menopausia**

19 al 23 de mayo del 2008

Madrid, España

[www.imsmadrid2008.com](http://www.imsmadrid2008.com)

## Identificación del perfil de metaloproteasas de matriz extracelular en membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino mediante microarreglos solubles\*

Nardhy Gómez López,\* Guadalupe Estrada Gutiérrez,\* Jorge Beltrán Montoya,\*\* Aurora Espejel Núñez,\* Felipe Vadillo Ortega\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Antecedentes:** la rotura fisiológica y patológica de las membranas es un fenómeno complejo con diversos procesos bioquímicos, se sabe que en membranas de tejidos a término la actividad colagenolítica aumenta y el contenido de colágena disminuye respecto de las pretérmino. La identificación de estos procesos en el mecanismo de rotura permitió proponer que las membranas fetales y la decidua pueden responder a estímulos bioquímicos y mecánicos, y producir mediadores que degradan la matriz extracelular de las membranas.

**Objetivo:** identificar simultáneamente, mediante microarreglo soluble, diferentes metaloproteasas de matriz extracelular en extractos de membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino.

**Pacientes y métodos:** mediante estudio biomédico experimental se obtuvieron explantes de membranas corioamnióticas de cuatro grupos de mujeres (n = 6). Grupo 1: a término sin trabajo de parto espontáneo; grupo 2: a término con trabajo de parto espontáneo; grupo 3: a término con rotura prematura de membranas, y grupo 4: con parto pretérmino. Los explantes se incubaron durante 24 h, se homogeneizaron y filtraron. En los extractos simultáneamente hubo MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 y 13.

**Resultados:** las metaloproteasas más abundantes en todos los extractos de membranas corioamnióticas fueron la 8 y la 2. Sin embargo, la concentración de la 8 en el grupo 3 fue significativamente mayor respecto de los grupos 1 y 2 ( $p = 0.01$ ), y mayor en el grupo 4 respecto del grupo 1 ( $p = 0.01$ ).

**Conclusiones:** la activación de los procesos celulares que ocasionan la colagenólisis de las membranas corioamnióticas bajo condiciones fisiológicas es diferente en los casos de rotura prematura de membranas o parto pretérmino, y se caracteriza por altas concentraciones de MMP-8.

**Palabras clave:** microarreglo soluble, rotura de membranas, rotura prematura de membranas, metaloproteasas de matriz extracelular, membranas corioamnióticas.

### ABSTRACT

**Background:** Physiological and pathological membrane rupture is a complex phenomenon with different biochemical processes; it is known that collagenolytic activity rises and collagen content diminishes within term tissue membranes in comparison to preterm membranes. Identification of these processes within rupture mechanism allows to suggest that fetal membranes and decidua can respond to biochemical and mechanical stimulus alike, and to produce mediators that degrade matrix of intracellular membranes.

**Objective:** To identify simultaneously, with a soluble microarray, different matrix metalloproteinases in extracts from amniochorion of pregnancies at term and preterm.

**Patients and methods:** Biomedical experimental study where amniochorion explants were obtained from four women groups. Group 1: at term with spontaneous labor; group 2: at term without labor; group 3: at term with premature rupture of membranes, and group 4: preterm labor. Explants were cultured for 24 h and then homogenized in their own culture media to obtain cell free extracts. MMP were identified in these extracts using a soluble microarray for MMPs that included: MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12 and -13.

**Results:** MMP-8 and -2 were the enzymes most abundant in all the extracts of amniochorion. However, the concentration of MMP-8 in the extracts of group 3 (PROM) was significantly greater in comparison with the extracts of groups 1 and 2 ( $p = 0.01$ ). The MMP-8 also was in greater concentration in the extracts of group 4 (preterm labor) in comparison with in the extracts of group 1 ( $p = 0.01$ ).

**Conclusion:** Activation of cellular processes that lead to the degradation of connective tissue in the MCA under physiological conditions seems to defer in originating tissues from cases with PROM or preterm labor, and this activation is characterized by an increase in the concentration of MMP-8.

**Key words:** soluble microarray, rupture of membranes, premature rupture of membranes, matrix metalloproteinases, chorioamniotic membranes.

## RÉSUMÉ

**Antécédents** : la rupture physiologique et pathologique des membranes est un phénomène complexe comportant des procès biochimiques divers, on sait que dans des membranes de tissus à terme l'activité collagène-lytique augmente et le contenu de collagène diminue au respect des avant-terme. L'identification de ces procès dans le mécanisme de rupture a permis de proposer que les membranes fœtales et la caduque peuvent répondre à des stimulus biochimiques et mécaniques et produire des médiateurs qui dégradent la matrice extracellulaire des membranes.

**Objectif** : identifier simultanément au moyen des puces à ADN solubles des différentes métaloprotéases de matrice extracellulaire en extraits des membranes chorioamniotiques de grossesses à terme et avant-terme.

**Matériel et méthodes** : au moyen d'étude biomédicale expérimentale on a obtenu des explants de MCA de quatre groupes de femmes ( $n = 6$ ). Groupe 1 : à terme sans travail spontané, groupe 2 : à terme avec travail spontané, groupe 3 : à terme avec rupture prématurée des membranes et groupe 4 : avec accouchement avant-terme. Les explants ont été incubés pendant 24 h, ils ont été homogénéisés et filtrés. Dans les extraits il y a eu simultanément MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 et 13.

**Résultats** : les MMP les plus abondantes dans tous les extraits de MCA ont été la 8 et la 2. Cependant, la concentration de la 8 dans le groupe 3 a été significativement majeure au respect des groupes 1 et 2 ( $p = 0.01$ ) et majeur dans le groupe 4 au respect du groupe 1 ( $p = 0.01$ ).

**Conclusions** : l'activation des procès cellulaires qui provoquent la collagénolyse des MCA sous conditions physiologiques est différente dans les cas de RPM ou accouchement avant-terme et se caractérise par de hautes concentrations de MMP-8.

**Mots-clés** : puces à ADN solubles, rupture des membranes, rupture prématurée des membranes, métaloprotéases de matrice extracellulaire, membranes chorioamniotiques.

## RESUMO

**Antecedentes**: A quebra fisiológica e patológica das membranas é um fenômeno complexo com diversos processos bioquímicos, sabe-se que em membranas de tecidos em términos da atividade colagenolítica aumenta e em pretérmino o conteúdo de colágeno diminui. A identificação desses processos em mecanismo de quebra permitiu propor que a membranas fetais e a decidua podem responder a estímulos bioquímicos e mecânicos, e produzir mediadores que degradam a matriz extracelular das membranas.

**Objetivo**: Identificar simultaneamente mediante micro reparo solúvel, diferentes metilprotease de matriz extracelular em extratos de membranas corioamnióticas de gravidez em término e pretérmino.

**Material e métodos**: Através de estudo biomédico experimental obtiveram níveis de membranas corioamnióticas de quatro grupos de mulheres ( $n = 6$ ). Grupo 1: em término sem trabalho de parto espontâneo; grupo 2: em término com trabalho de parto espontâneo; grupo 3: em término com quebra prematura de membranas; e grupo 4: com parto pretérmino. Os níveis foram incubados durante 24 horas, homogenizado e filtrado. Nos extratos tiveram MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 e 13, simultaneamente.

**Resultados**: Metilprotease mais abundantes em todos os extratos de membranas corioamnióticas foram na 8 e na 2. Entretanto a concentração da 8 do grupo 3 foi significativamente maior em relação dos grupos 1 e 2 ( $p = 0,01$ ), e maior no grupo quatro em relação ao grupo 1 ( $p = 0,01$ ).

**Conclusões**: A ativação dos processos celulares que ocasionam a colagenólise das membranas corioamnióticas baixo condições fisiológicas é diferente nos casos de quebra prematura de membranas ou parto pretérmino, e caracteriza-se por altas concentrações de MMP-8.

**Palavras-chave**: micro reparo solúvel, quebra de membranas, quebra prematura de membranas, metilprotease de matriz extracelular, membranas corioamnióticas.

- \* Este trabajo obtuvo el primer lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación básica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).
- \* Dirección de investigación.
- \*\* Departamento de especialidades médicas.  
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel.: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Este artículo debe citarse como: Gómez LN, Estrada GG, Beltrán MJ, Espejel NA, Vadillo OF. Identificación del perfil de metaloproteasas de matriz extracelular en membranas corioamnióticas de embarazos a término y pretérmino mediante microarreglos solubles. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):32-37.

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

Las membranas corioamnióticas o fetales son tejidos extraembrionarios, y constituyen el contenedor estéril que permite el crecimiento y desarrollo normal del feto y lo aíslan durante la gestación. Esta estructura funciona, además, como una importante barrera inmunológica y como sitio altamente especializado que permite la interacción entre madre y feto mediada por señales autocrinas y paracrinas en ambas direcciones. Las membranas están formadas por dos tejidos superpuestos (amnios y corion) que funcionan como una unidad estructural y funcional, están compuestos de distintos tipos celulares, incluidas células epiteliales, mesenquimatosas, inmunológicas y trofoblastos, embebidos en una matriz extracelular, que les proporciona sus propiedades biomecánicas y cuyo principal componente es la colágena. La composición específica señala que la colágena

intersticial, tipos I y III con pequeñas cantidades de tipos V, VI y VII, provee la mayor fuerza de tensión a estas estructuras. Sin embargo, la colágena de tipo IV distribuida en las distintas capas histológicas de las membranas conforma un contenedor tridimensional de las fibras de colágena tipos I y III. Esta composición y arreglo de la colágena le confiere a las membranas sus características de extensibilidad, elasticidad y retracción, que son fundamentales para el mantenimiento del feto hasta el final de la gestación.<sup>1,2</sup>

La rotura de las membranas corioamnióticas, en forma sincrónica con las contracciones uterinas y la dilatación y el borramiento del cuello uterino, es un evento que se manifiesta en conjunto para facilitar la expulsión del feto; sin embargo, en algunas mujeres las membranas se rompen en ausencia de todos los demás eventos que caracterizan al trabajo de parto (rotura prematura de membranas). En la actualidad se ha demostrado que la rotura de las membranas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, representa un fenómeno complejo que involucra diversos procesos bioquímicos entre los que se encuentran la secreción de diversos mediadores de inflamación y la alteración de la estructura de la colágena que les da soporte. En las membranas provenientes de tejidos a término la actividad colagenolítica está aumentada, y como consecuencia el contenido de colágena disminuye en relación con las membranas pretérmino.<sup>3-5</sup> La identificación de estos procesos, en el mecanismo de rotura, ha permitido proponer que las membranas fetales y la decidua pueden responder a estímulos bioquímicos y mecánicos, para producir mediadores, como prostaglandinas, citocinas y enzimas que degradan la matriz extracelular de las membranas.<sup>4,6,7</sup>

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, *matrix metalloproteinases*) son enzimas dependientes de iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .<sup>8</sup> Estas enzimas pueden subagruparse estructuralmente, de acuerdo con la homología que muestran en sus dominios y con la especificidad por su sustrato, en colagenasas, gelatinasas, estromelisin, metaloproteasas de matriz tipo membrana (MT-MMP, *membrane-type matrix metalloproteinases*) y otras MMP, donde se encuentran enzimas que aún no han sido completamente caracterizadas.<sup>9</sup> En la bibliografía se ha reportado la participación de diversas metaloproteasas, como las 1, 2, 3, 8, 9, 10 y 11, como constituyentes fisiológicos del microambiente que rodea a las membranas, y algunas de ellas vinculadas con casos de rotura prematura de membranas pretérmino.<sup>2,10</sup>

El objetivo de este trabajo fue identificar simultáneamente diferentes metaloproteasas en extractos de membranas corioamnióticas mediante un microarreglo soluble (microesferas unidas a anticuerpos específicos) y encontrar la relación de su concentración con el trabajo de parto en condiciones fisiológicas y patológicas.

## PACIENTES Y MÉTODOS

### Pacientes

En la Unidad de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología se obtuvieron membranas corioamnióticas de mujeres sin hallazgos clínicos o microbiológicos, o ambos, de infección con las siguientes características:

*Grupo 1.* Embarazos de 37 a 40 semanas de gestación con indicación de operación cesárea en los que se comprobó ausencia de trabajo de parto espontáneo.

*Grupo 2.* Embarazos de 37 a 40 semanas de gestación con trabajo de parto espontáneo.

*Grupo 3.* Embarazos de 37 a 40 semanas con rotura prematura de membranas corioamnióticas, sin importar la vía de resolución.

*Grupo 4.* Embarazos con trabajo de parto pretérmino, sin importar la vía de resolución.

### Metodología

#### *Obtención de extractos de membranas corioamnióticas*

En la sala de expulsión, inmediatamente después de ser extraída la placenta, se tomó una muestra de toda la superficie de las membranas corioamnióticas, para análisis microbiológico y descartar infección. Las membranas corioamnióticas se transportaron al laboratorio en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con antibiótico-antimicótico al 1%, y una vez ahí y en condiciones de esterilidad se lavaron con solución salina fisiológica, se extendieron sobre una superficie plana y se hicieron explantes de 45 cm<sup>2</sup> que se cultivaron en 45 mL de DMEM complementado con 1% de piruvato de sodio y 1% de antibiótico-antimicótico. Después de esta incubación, los explantes se homogenizaron con un Polytron (KINEMATICA AG) en su medio condicionado, se centrifugaron a

4,000 rpm durante dos horas, se filtraron con una membrana de 0.22  $\mu$  (CORNING) y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

*Cuantificación de las metaloproteasas de matriz extracelular en los extractos de las membranas corioamnióticas*

En los extractos de membranas corioamnióticas se identificaron diferentes metaloproteasas por medio de un microarreglo soluble de microesferas unidas a anticuerpos anti metaloproteasas, Bio-Plex™ Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories). Con este microarreglo se pueden detectar ocho metaloproteasas: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 y 13, mediante microesferas unidas a anticuerpos específicos y a fluorocromos. Cuando las metaloproteasas están unidas a su anticuerpo específico, el fluorocromo (ficoeritrina) se excita con un láser de 532 nm y se captura la luz emitida, a mayor fluorescencia mayor concentración de la metaloproteasa en la muestra. Las diferencias de intensidad de la fluorescencia de cada metaloproteasa permiten cuantificar la concentración de cada una de estas moléculas por fluorometría.

*Análisis estadístico*

Los datos no tuvieron distribución normal, por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas (U de Mann-Whitney) para evaluar diferencias estadísticas.

## RESULTADOS

Los resultados del microarreglo soluble anti metaloproteasas mostraron que en los cuatro grupos de estudio las metaloproteasas más abundantes en los extractos de membranas corioamnióticas fueron la 8 y la 2. Sin embargo, la concentración de metaloproteasa 8 en los extractos de membranas corioamnióticas provenientes de tejidos a término con rotura prematura de membranas fue significativamente mayor en comparación con los extractos de membranas corioamnióticas de tejidos a término, sin y con trabajo de parto ( $p = 0.01$  en ambos casos). La metaloproteasa 8 también tuvo mayor concentración en los extractos de membranas corioamnióticas provenientes de tejidos pretérmino en comparación con los extractos de membranas corioamnióticas de tejidos a término sin trabajo de parto ( $p = 0.01$ , figura 1).

## DISCUSIÓN

El mecanismo molecular que desencadena la rotura de las membranas corioamnióticas en condiciones fisiológicas y patológicas, aún no está totalmente establecido. Sin embargo, se ha demostrado que este episodio es muy complejo y comprende distintos procesos bioquímicos, principalmente la degradación de la matriz extracelular por las metaloproteasas de matriz extracelular.<sup>11</sup>

Se sabe que la metaloproteasa 1 es una enzima que constituye fisiológicamente al líquido amniótico, y el incremento en su concentración se asocia con casos de rotura prematura de membranas pretérmino.<sup>10</sup> En nuestro estudio no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio; sin embargo, hay tendencia a encontrarla en mayor concentración en los extractos de tejidos con rotura prematura de membranas y parto pretérmino.

La MMP-2 se encuentra en concentraciones constantes en el líquido amniótico y en los tejidos gestacionales a lo largo del embarazo, su expresión no tiene variaciones en las membranas corioamnióticas a término o pretérmino y se ha localizado en el amnios, en la capa de trofoblasto del corion y en la decidua.<sup>12,13</sup> En nuestro estudio tampoco se encontraron variaciones en la concentración de esta enzima, y por ello se considera que no tiene participación en los procesos de degradación del tejido conectivo relacionados con el trabajo de parto.

La expresión de MMP-3 y MMP-7, junto con otras estromelisinases, se ha comprobado en membranas fetales, placenta y líquido amniótico, por lo que se considera que estas enzimas son capaces de degradar componentes de la matriz extracelular, incluidas la colágena tipo IV, laminina, elastina y los proteoglicanos.<sup>14</sup> En nuestro análisis no se comprobaron cambios significativos de MMP-3 o MMP-7 al activarse el trabajo de parto, ni en las condiciones de rotura prematura de membranas y parto pretérmino.

En su mayor parte la MMP-8 es producida por células del corion en las membranas fetales; sin embargo, se sabe que su concentración aumenta hasta en cinco veces en los tejidos de mujeres con trabajo de parto, respecto de los de aquellas sin trabajo de parto, y también que durante el trabajo de parto aumenta la expresión del ARNm de esta enzima.<sup>15</sup> Nuestros resultados no confirman estos hallazgos, y aunque existe un incremento en la cantidad de metaloproteasa 8 detec-

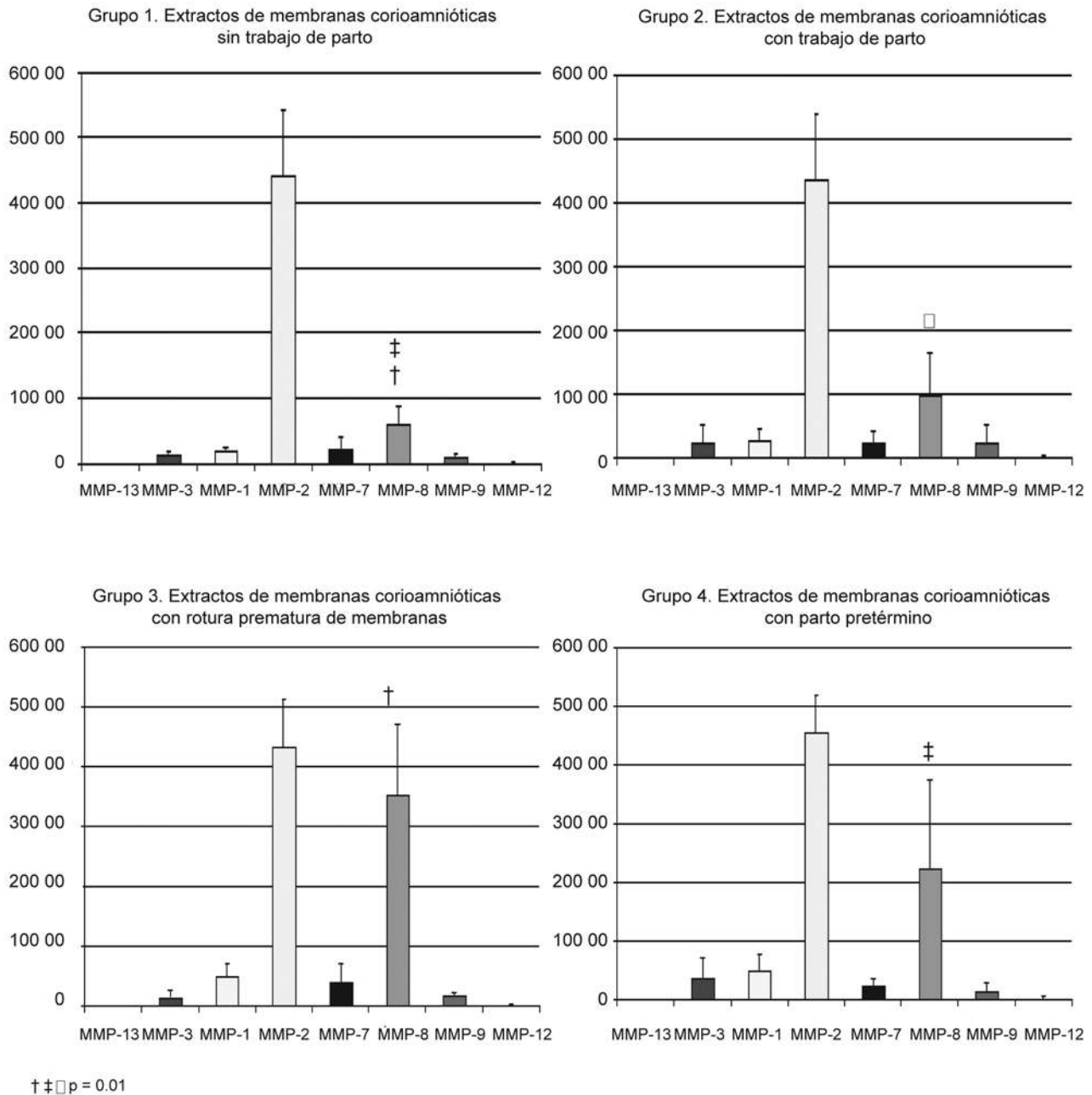


**Figura 1.** Microarreglo soluble de microesferas unidas a anticuerpos anti metaloproteasas (Bio-Plex™ Suspension Array System). Las metaloproteasas 8 y 2 fueron las dos enzimas más abundantes en todos los extractos de membranas corioamnióticas. Sin embargo, la metaloproteasa 8 se encontró en mayor concentración en los extractos con rotura prematura de membranas y parto pretérmino respecto de los demás grupos. Las barras representan el promedio de los datos y la DE ( $n = 6$ , cada grupo).

tada en los extractos de las membranas con trabajo de parto, no es significativo. No obstante, al compararse los extractos de las membranas afectadas con rotura prematura de membranas y parto pretérmino con los de sin trabajo de parto, sí hubo diferencias.

Tanto en el epitelio amniótico como en el corion se ha comprobado la expresión de la metaloproteasa 9; sin embargo, se sabe que ésta aumenta en el momento del trabajo de parto. También se han relacionado concentraciones elevadas de esta enzima en el líquido

amniótico durante el trabajo de parto y la rotura prematura de membranas.<sup>5,11,16</sup> Nuestros resultados no arrojaron diferencias en las concentraciones de esta enzima en cualquiera de las condiciones exploradas, lo que pudo deberse a que la metaloproteasa 9 es capaz de formar un complejo estable imposible de disociarse en las condiciones en que fue preparado el extracto.

La metaloproteasa 12 es producida principalmente por macrófagos y se ha asociado con diversas enfermedades, no obstante, se conoce poco de esta enzima en los tejidos gestacionales.<sup>17</sup> En el presente estudio se encontró en concentraciones muy bajas y sin diferencias entre los grupos, lo que explica su poca o nula relevancia en el embarazo.

La metaloproteasa 13 es expresada y producida por las membranas fetales y es un constituyente fisiológico del líquido amniótico. Esta enzima no se ha vinculado con el parto pretérmino.<sup>18</sup> En nuestro sistema esta enzima no se detectó en ninguno de los cuatro grupos de trabajo, lo que se contrapone con lo descrito en la bibliografía.

## CONCLUSIÓN

Las membranas corioamnióticas y las células inmunitarias infiltradas en estos tejidos podrían participar en la rotura de las membranas, al producir e inducir la producción de metaloproteasas y otros mediadores, por esto es relevante cuantificar las metaloproteasas secretadas por las membranas corioamnióticas.

En este estudio se analizó de manera simultánea la concentración relativa de todas las metaloproteasas relevantes para la degradación del tejido conectivo del corioamnion en cuatro condiciones diferentes asociadas con el trabajo de parto normal o anormal. El uso de estas técnicas proteómicas confiere un enfoque que hasta ahora no se había intentado en el análisis de secreciones complejas, que permite vislumbrar en el futuro inmediato su utilización en el estudio clínico del problema del parto pretérmino y la rotura prematura de membranas. Así se podrá intentar el análisis de la composición del perfil de este grupo de enzimas en secreciones cervicovaginales para, con un enfoque más amplio, proponer el uso de perfiles de este tipo de moléculas en la identificación de la progresión normal y anormal del trabajo de parto.

## REFERENCIAS

1. Bryant-Greenwood GD. The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998;19(1):1-11.
2. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338(10):663-70.
3. Vadillo OF, Bermejo ML, Pfeffer F. Ruptura prematura de membranas: mecanismos de la enfermedad. *Perinatol Reprod Hum* 1994;8(4):180-9.
4. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amnio-chorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146(1):148-56.
5. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, et al. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(4):1371-6.
6. Lamont RF, Rose M, Elder MG. Effect of bacterial products on prostaglandin E production by amnion cells. *Lancet* 1985;2(8468):1331-3.
7. Svanborg C, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr Opin Microbiol* 1999;2(1):99-105.
8. Fata JE, Ho AT, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(1):77-95.
9. McCawley LJ, Matrisian LM. *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(5):534-40.
10. Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):914-20.
11. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, Cruz NM, Ayala RA, Lama MS. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):84-88.
12. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Collagenolytic enzymes (gelatinases) and their inhibitors in human amniochorionic membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4):731-41.
13. Xu P, Alfaiy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1353-61.
14. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999;94(3):435-40.
15. Arechavaleta-Velasco F, Marciano D, Diaz-Cueto L, Parry S. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in human chorion during labor. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(3):843-50.
16. Harirah H, Donia SE, Hsu CD. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-9 and interleukin-6 in predicting intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):80-4.
17. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993;268(32):23824-9.
18. Fortunato SJ, LaFleur B, Menon R. Collagenase-3 (MMP-13) in fetal membranes and amniotic fluid during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2003;49(2):120-5.

## Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación\*

Rodrigo Vega Sánchez,\* Marisol Castillo Castrejón,\* Yolanda Hornelas Orozco,\*\*\* Nardhy Gómez López,\* Jorge Beltrán Montoya,\*\* Felipe Vadillo Ortega\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Antecedentes:** la integridad física y estructural de las membranas corioamnióticas se debe a un preciso proceso de síntesis y degradación de colágena; durante el trabajo de parto aumenta la actividad colagenolítica a su alrededor, lo que conduce a pérdida estructural y debilitamiento de su resistencia mecánica, principal causa de su rotura en condiciones fisiológicas y patológicas. La comprensión de su estructura tridimensional es indispensable para caracterizar al trabajo de parto normal y en enfermedades específicas.

**Objetivo:** analizar la estructura tridimensional de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación.

**Material y métodos:** estudio descriptivo para analizar la distribución de las colágenas tipos I, III y IV en membranas corioamnióticas humanas a término (37 a 40 semanas de gestación) sin trabajo de parto, mediante microscopías confocal y electrónica de barrido.

**Resultados:** se observó que en el amnios las células conforman un epitelio homogéneo aunque sin contacto intercelular estrecho (epitelio clásico) lo que contribuiría al transporte de moléculas por difusión transmembranal. También que el tejido conectivo del amnios es una red fibrilar compleja de colágena tipo I, soportada estructuralmente por la colágena tipo IV. Por el contrario, el corion tiene gran cantidad de células en estrecho contacto, con muy pocas fibras de colágena tipos I y III, y casi ninguna de colágena tipo IV.

**Conclusiones:** el análisis tridimensional del tejido conectivo de las membranas corioamnióticas, particularmente del amnios, permite entender el papel central que desempeñan tanto la colágena tipo IV en el mantenimiento de su estructura, como las enzimas colagenolíticas en su degradación y rotura en condiciones normales y patológicas.

**Palabras clave:** membrana corioamniótica humana, colágena, colagenólisis, microscopia conofocal, microscopia electrónica de barrido.

### ABSTRACT

**Background:** Physical and structural chorioamniotic membranes integrity is due to a precise process of synthesis and degradation of collagen; surrounding collagenolytic activity raises during labor, what leads to a structural loss and mechanical resistance weakening, the main cause of its rupture under physiological and pathological conditions. Understanding of its three-dimensional structure is essential to characterize normal and pathological labor.

**Objective:** To analyze three-dimensional structure of human chorioamniotic membranes at gestational term.

**Material and methods:** Descriptive study to analyze the distribution of collagens type I, II and IV in human chorioamniotic membranes at term (37 to 40 gestational weeks) without labor by means of confocal and electronic scan microscopy.

**Results:** Cells' amnios shapes a homogeneous epithelium without a close intercellular contact (classic epithelium) what may contribute to transmembranal diffusion molecules' transport. Amnios connective tissue is too a complex fibrilar net of type I collagen, structurally supported by type IV collagen. On the contrary, corion has a great amount of cells in close contact, with a few fibers of type I and II collagen, and almost none of type IV collagen cells.

**Conclusion:** Three-dimensional analysis of chorioamniotic membranes connective tissue, particularly amnios, allows to understand the main role of type IV collagen on supporting its structure, as well as collagenolytic enzymes in its degradation and rupture under normal and pathological conditions.

**Key words:** human chorioamniotic membrane, collagen, collagenolysis, conofocal microscopy, electronic scan microscopy.

### RÉSUMÉ

**Antécédents :** l'intégrité physique et structurelle des membranes chorioamniotiques est due à un procès précis de synthèse et dégradation de collagène, pendant le travail augmente l'activité collagène-lytique aux environs, ce qui conduit à une perte structurelle et affaiblissement de leur résistance mécanique, cause principale de leur rupture sous des conditions physiologiques et pathologiques. La compréhension de leur structure tridimensionnelle est indispensable pour caractériser le travail normal et dans des maladies spécifiques.

**Objectif** : faire l'analyse de la structure tridimensionnelle des membranes chorioamniotiques humaines au terme de la gestation.

**Méthodologie** : étude descriptive pour faire l'analyse de la distribution des collagènes des types I, III et IV dans des membranes chorioamniotiques humaines à terme (37 à 40 semaines de gestation) sans travail, au moyen de microscopies confocale et électronique à balayage.

**Résultats** : on a observé que dans l'amnios les cellules conforment un épithélium homogène mais sans contact intercellulaire étroit (épithélium classique) ce qui contribuerait au transport des molécules par diffusion transmembranaire. De même que le tissu connectif de l'amnios est un réseau fibrillaire complexe de collagène type I, soutenu principalement par le collagène type IV. Contrairement, le chorion a une grande quantité de cellules en contact étroit, avec très peu de fibres de collagène type I et III, et presque aucune de collagène type IV.

**Conclusions** : l'analyse tridimensionnelle du tissu connectif des membranes chorioamniotiques, particulièrement de l'amnios, permet de comprendre le rôle central que jouent tant le collagène type IV dans le maintien de leur structure, comme des enzymes collagène-lytiques dans leur dégradation et rupture sous des conditions normales et pathologiques.

**Mots-clés** : membrane chorioamniotique humaine, collagène, collagénolyse, microscopie confocale, microscopie électronique à balayage.

## RESUMO

**Antecedentes**: A integridade física e estrutural das membranas corioamnióticas é devida a um preciso processo de sínteses e degradação de colágeno. Durante o trabalho de parto aumenta a atividade colagenolítica ao seu redor, o que conduz a perda estrutural e enfraquecimento de sua resistência mecânica, principal causa de sua quebra em condições fisiológicas e patológicas. A compreensão de sua estrutura tridimensional é indispensável para caracterizar o trabalho de parto normal e as doenças específicas.

**Objetivo**: Analisar a estrutura tridimensional das membranas corioamnióticas humanas em término da gestação.

**Metodologia**: Estudo descritivo para analisar a distribuição dos colágenos tipos I, III e IV em membranas corioamnióticas humanas em término (37 a 40 semanas de gestação) sem trabalho de parto, mediante microscópias confocal e eletrônica de varredura.

**Resultados**: Foi observado que em amnios as células conformam um epitélio homogêneo ainda que sem contato intercelular estreito (epitélio clássico) o que contribuiria o transporte de moléculas por difusão transmembranar. Também que o tecido que conecta os amnios é uma rede fibrilar complexa de colágeno tipo I, suportada estruturalmente pelo colágeno tipo IV. Pelo contrário, o córion tem grande quantidade de células em estreito contato, com poucas fibras de colágeno tipos I e III, e quase nenhuma de colágeno tipo IV.

**Conclusões**: A análise tridimensional do tecido conectivo das membranas corioamnióticas, particularmente dos amnios, permite entender o papel central que desempenham tanto o colágeno tipo IV de manutenção da estrutura, como as enzimas colagenolíticas em sua degradação e quebra em condições normais e patológicas.

**Palavras-chave**: membrana corioamniótica humana, colágeno, colagenólises, microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura.

- Este trabajo obtuvo el segundo lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación básica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).

\* Dirección de investigación.

\*\* Departamento de especialidades médicas.  
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, México, DF.

\*\*\* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, DF.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel.: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Este artículo debe citarse como: Vega SR, Castillo CM, Hornelas OY, Gómez LN, Beltrán MJ, Vadillo OF. Análisis tridimensional de la estructura de las membranas corioamnióticas humanas al término de la gestación. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):38-44.

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

Las membranas corioamnióticas humanas conforman el tejido extraembrionario que lo aísla y le provee protección ante el estrés mecánico de toda la gestación, además de tener funciones secretoras importantes. Dichas membranas están formadas por dos capas adyacentes, el corion y el amnios, que a su vez están compuestas por diversos tipos celulares. La gran resistencia mecánica que caracteriza a estas membranas se debe a una amplia estructura de tejido conectivo, constituida sobre todo por distintos tipos de colágena.<sup>1</sup>

Las colágenas tipo I y III principalmente forman una red fibrilar en todas las capas que componen el amnios (compacta, esponjosa y reticular); se localizan también, aunque en mucho menor medida, en la decídua cercana a los trofoblastos del corion. La colágena tipo IV es el principal componente de la membrana

basal que sostiene al epitelio amniótico y de la pseudomembrana basal del corion. Hay datos de que este tipo de colágena también forma las estructuras no fibrilares en la capa reticular del amnios, por lo que se sugiere que sirve como soporte estructural de la red fibrilar de las colágenas I y III.<sup>2,3</sup>

Durante la gestación, el mantenimiento de la integridad física y estructural de las membranas corioamnióticas se logra mediante un proceso equilibrado de síntesis y degradación de colágena.<sup>4</sup> Sin embargo, cuando se manifiesta el trabajo de parto, la actividad colagenolítica alrededor de ellas se incrementa, lo que conduce a la pérdida estructural y finalmente al debilitamiento de su resistencia mecánica. Este mecanismo es la principal causa de la rotura de dichas membranas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.<sup>5</sup> Por esto es indispensable la adecuada comprensión de la estructura tridimensional de las membranas en la caracterización del trabajo de parto normal y en enfermedades específicas, como la rotura prematura de membranas.

En este trabajo abordamos el análisis estructural de las membranas corioamnióticas de forma tridimensional, mediante dos metodologías distintas: las microscopías confocal y electrónica de barrido.

## METODOLOGÍA

### Muestras biológicas

Se utilizaron membranas corioamnióticas obtenidas en la Unidad de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Todas provenían de mujeres que tuvieron embarazo a término (37 a 40 semanas de gestación) por cesárea sin indicios de trabajo de parto, con el fin de asegurar la integridad estructural del tejido conectivo que las conformaba. Las membranas se cortaron cerca del sitio de unión a la placenta y se transportaron en medio DMEM con 1% de antibiótico-antimicótico. Una vez en el laboratorio, se lavaron con solución salina fisiológica y se procesaron de acuerdo con la metodología específica.

### Marcaje fluorescente de anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para colágena humana de los tipos I, III y IV (Calbio-

chem, La Jolla, EU). Estos anticuerpos se marcaron con los fluorocromos Alexa-fluor 546, Alexa-fluor 532 y Alexa-fluor 647, respectivamente, de acuerdo con el procedimiento indicado por el proveedor, con modificaciones (Molecular Probes, Eugene, EU). Para el marcaje, se mezclaron 20 µg del anticuerpo con el fluorocromo y con 2 µL de bicarbonato de sodio 1M. Esta mezcla se incubó en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante una hora, seguido de incubación a 4°C durante toda la noche. Para purificar el anticuerpo marcado y eliminar el exceso de fluorocromo, después del marcaje se agregaron 78 µL de PBS para obtener un volumen final de 100 µL, el cual se hizo pasar por la resina de purificación y se centrifugó dos veces durante cinco minutos a 1100 rpm x g. La concentración final, así como la tasa de marcaje de cada anticuerpo, se calcularon a partir de los valores de absorbancia obtenidos por espectrofotometría.

### Tinción de membranas corioamnióticas

En cada membrana corioamniótica a procesar, el corion y el amnios se separaron manualmente, y de cada uno se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>.

Para la tinción de los tejidos se preparó una mezcla de los anticuerpos marcados anti colágena I (dilución 1:100), colágena III (dilución 1:100) y colágena IV (dilución 1:50) en PBS. Los tejidos se incubaron en 500 µL de esta mezcla durante toda la noche, a 4°C, en la oscuridad. Como control negativo se usaron fragmentos incubados en 500 µL de PBS.

Finalmente, los tejidos íntegros se montaron en un portaobjetos con 10 µL de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector). El DAPI es un colorante fluorescente que se utiliza para teñir núcleos de células. En esta parte del trabajo se incluyeron fragmentos de tres membranas distintas.

### Microscopia confocal

Después del montaje, los tejidos se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta, con el empleo del programa Zeiss LSM. Se observaron tres campos distintos en cada uno de los fragmentos. Las reconstrucciones tridimensionales se generaron en el mismo programa a partir de secuencias de imágenes individuales con espesores variables.

### Microscopia electrónica de barrido

Una vez lavadas las membranas corioamnióticas, se cortaron pedazos de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup> y se fijaron de inmediato en formol neutro. Los fragmentos se deshidrataron con diluciones crecientes de etanol y finalmente se guardaron en acetona a 4°C. Después, los tejidos se dejaron secar durante todo el día en un secador de punto crítico Technics CPA-II. Cuando estuvieron secos, los tejidos se montaron en portamuestras con ayuda de un microscopio óptico. Finalmente se recubrieron con iones de oro mediante el equipo Ion Sputter JSC 1100.

Los tejidos se observaron en el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360LV, del Servicio Académico de Microscopia Electrónica de Barrido, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## RESULTADOS

### Microscopia confocal

Al analizar los fragmentos de explantes de amnios, la marca fluorescente de DAPI, correspondiente a los núcleos de las células, se observó principalmente en un extremo del explante, que corresponde al epitelio amniótico. También se observaron otros núcleos dentro de la estructura de tejido conectivo, que corresponde a la capa de fibroblastos.

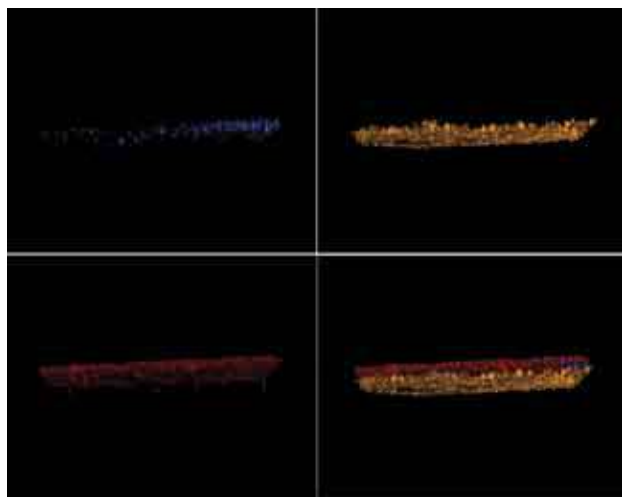


**Figura 1.** Reconstrucción tridimensional del amnios mediante microscopia confocal. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, núcleos; amarillo, colágena tipo I; verde, colágena tipo III; rojo, colágena tipo IV (aumento 20X).

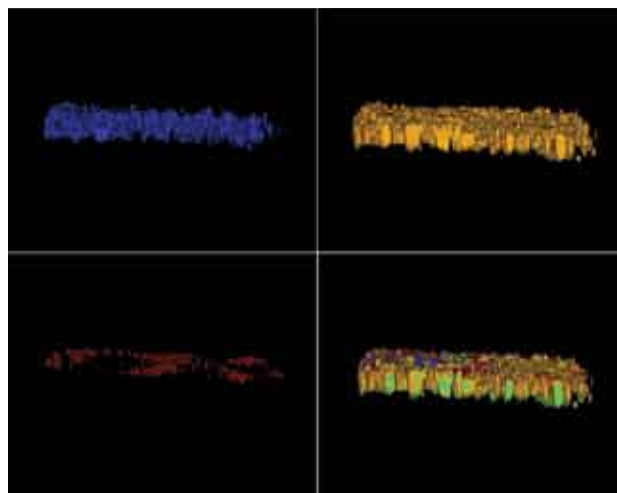


**Figura 2.** Reconstrucción tridimensional del corion mediante microscopia confocal. Los colores corresponden a las señales fluorescentes de: azul, núcleos; amarillo, colágena tipo I; verde, colágena tipo III; rojo, colágena tipo IV (aumento 20X).

La señal fluorescente correspondiente a la colágena tipo I se encontró distribuida de manera relativamente homogénea en las distintas capas. Prácticamente no hubo señal de colágena tipo III en el amnios.

La señal fluorescente que correspondió a la colágena tipo IV se observó inmediatamente debajo de la región de células epiteliales, que corresponde a la membrana basal. También se observó que esta marca fluorescente atravesaba ciertas regiones del amnios, con una distribución perpendicular a la señal de la colágena tipo I (figura 1).

En el corion la marca de los núcleos abarcaba todo el espesor del explante. Las señales correspondientes a las colágenas I y III colocaron en todo momento, y mostraron una distribución homogénea. La marca fluorescente de colágena tipo IV fue muy escasa, dispersa y limitada a la región correspondiente a la pseudomembrana basal (figura 2).

### Microscopia electrónica de barrido

El análisis del amnios por medio de esta técnica reveló que los amniocitos constituyen un epitelio continuo pero relativamente laxo (figuras 4 y 5). Las células del epitelio amniótico muestran una serie de proyecciones laterales del citoplasma que permiten la conexión entre células de modo característico. Se pudo observar con gran detalle que todo el espesor del amnios se con-

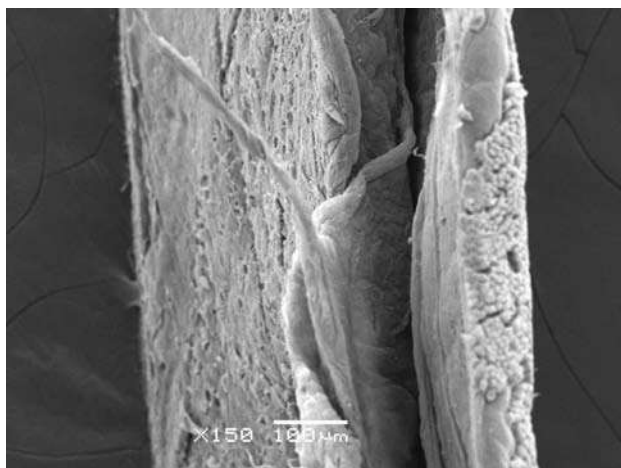


**Figura 3.** Vista transversal de las membranas corioamnióticas humanas. Se observa, del lado izquierdo, el corion, y del lado derecho, un poco más separado, el amnios (aumento 150x).

forma por una intrincada red de fibras que, aunque parecen ser de un diámetro similar, pueden formar estructuras más gruesas y complejas (figura 6).

En el corion se observó una gran cantidad de células de diversos tipos con estrecho contacto entre sí. Las fibras de colágena que se observaron en este tejido eran muy escasas y dispersas, y no formaban estructuras como las observadas en el amnios (figuras 7 y 8).

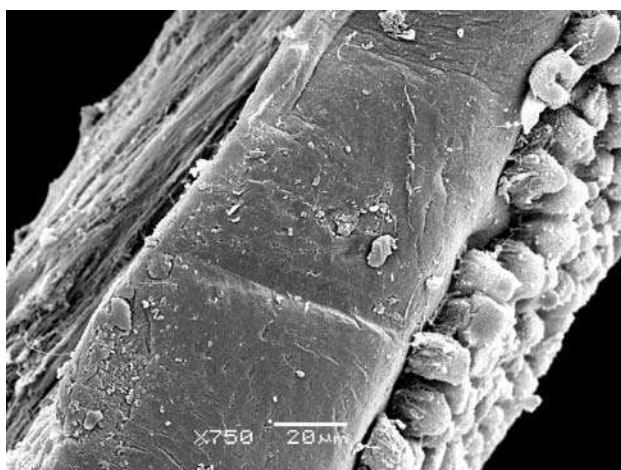


**Figura 4.** Vista transversal del amnios. Se observan del lado derecho los amniocitos que conforman el epitelio; en el centro, una porción de membrana basal que se ha plegado y cubre parcialmente la red de colágena que forma las distintas capas del amnios (izquierda) (aumento 750x).

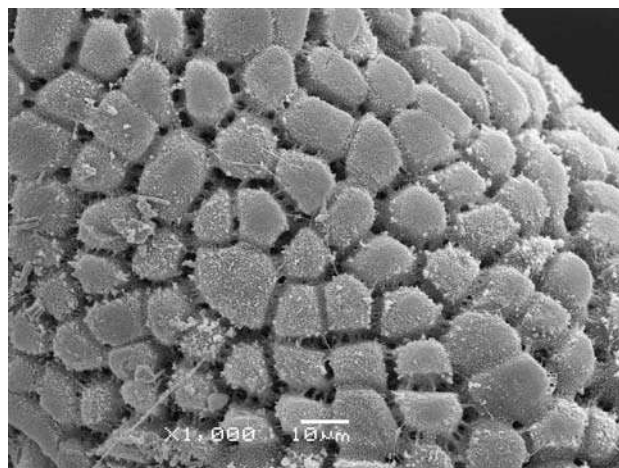


**Figura 5.** Vista frontal del epitelio amniótico (aumento 1,000x).

## DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue analizar la estructura de las membranas corioamnióticas de un modo distinto a lo descrito hasta hoy, en busca de enfoques metodológicos que permitieran observar a detalle cómo se conforma dicha estructura de manera tridimensional. De ahí que se decidiera usar la microscopia confocal para identificar simultáneamente los tres tipos de colágena más relevantes en las membranas, así como su distribución espacial; además, se usó la microscopia electrónica de barrido para observar detalladamente la organización de las poblaciones celulares, pero sobre todo la estructura de las fibras de colágena.

Con la microscopia electrónica de barrido del amnios se pudo observar que las células conforman un epitelio bastante homogéneo; sin embargo, el contacto entre los amniocitos no es tan estrecho como corresponde a un epitelio clásico, que separa compartimientos. En cambio, se observan puntos de uniones múltiples mediados por extensiones fibrilares entre las células, sin contacto directo entre las membranas celulares. Las estructuras de conexión intercelular no pudieron apreciarse en detalle y resta describir su naturaleza. No obstante, la forma en como se organiza el epitelio amniótico con una estructura cribosa permitiría el paso rápido de compuestos de gran tamaño molecular y explicar la gran capacidad del corioamnios para el transporte de moléculas por difusión transmembranal, que permite la comunicación desde y hacia la cara coriodecidual de las membranas corioamnióticas (figura

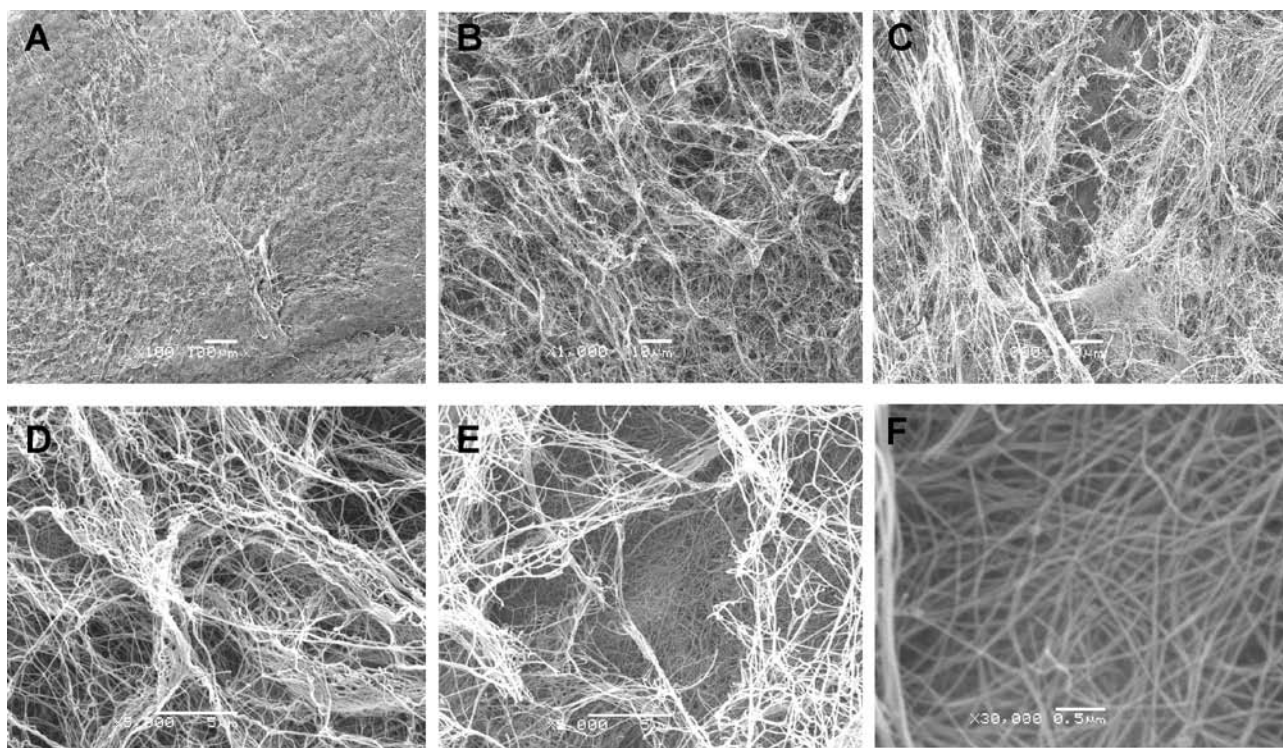


**Figura 6.** Amnios visto desde la cara adyacente al corion. Se puede observar la intrincada red de fibras de colágena que forman este tejido (aumentos: A, 100X; B y C, 1,000x; D y E, 5,000x; F, 30,000x).

5). Esta función explicaría propiedades funcionales que permiten el paso de macromoléculas, como las citocinas y enzimas, durante el trabajo de parto o en condiciones inflamatorias.<sup>6</sup>

También se observó que la mayor parte de la estructura tridimensional del amnios se conforma por una compleja red fibrilar que se extiende desde la membrana basal hasta la unión con el corion (figura 6). La microscopia confocal reveló que la mayor parte de dicha estructura se compone por colágena tipo I, cuya distribución es bastante homogénea y abarca todas las capas del amnios (figura 1), lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía;<sup>2</sup> sin embargo, no se observó alguna marca correspondiente a la colágena tipo III en este tejido, lo que podría explicarse porque los determinantes antigénicos de esta proteína están ocultos en la estructura tridimensional del tejido.

La señal fluorescente que corresponde a la colágena tipo IV se encontró muy cercana a la señal de los núcleos de los amniocitos, e incluso rodeando a estas estructuras (figura 1). Aunque sería necesario un análisis más detallado de las uniones intercelulares en los amnio-

citios, estas observaciones sugerirían que la colágena tipo IV, además de ser el principal constituyente de la membrana basal, podría ser la responsable de la unión entre los amniocitos y, por tanto, de mantener la integridad estructural del epitelio. Otra posibilidad sería que estas uniones intercelulares fueran similares a los llamados podocitos, proyecciones celulares que sirven normalmente como estructuras de anclaje, y que se han encontrado en la base de los amniocitos funcionando como unión de estas células a la membrana basal.<sup>7</sup>

Asimismo, pudimos observar que, en algunas partes del amnios, la colágena tipo IV también se localiza dentro de la zona de colágeno tipo I, aunque su distribución parece ser perpendicular a la de esta última (figura 1). Estas observaciones parecen comprobar, como se ha propuesto, que la colágena tipo IV cumple una importante función estructural al dar soporte a la red de fibras de colágena tipo I.<sup>2,8</sup>

El análisis del corion reveló, como se esperaba, una estructura tridimensional muy distinta a la del amnios. Con la microscopia electrónica de barrido se pudo observar una gran cantidad de células de distintos tipos,

que mantienen un estrecho contacto entre sí. En este caso, no se observaron las uniones intercelulares de tipo fibrilar, como las observadas entre los amniocitos, sino que el contacto directo entre las membranas celulares parece más evidente (figuras 7 y 8).

A diferencia del amnios, la microscopia confocal del corion reveló colágena tipo I y tipo III; estas moléculas se localizaron juntas en las mismas zonas, y su distribución fue homogénea a todo lo ancho del corion. Aquí, la colágena tipo IV fue muy escasa y se limitaba a la zona de la pseudomembrana basal, sin adentrarse en el tejido (figura 2). La microscopia electrónica de barrido mostró que el corion no tiene una estructura fibrilar tridimensional como la del amnios; de hecho, son muy pocas las fibras de colágena que se observaron en el corion (figura 7).

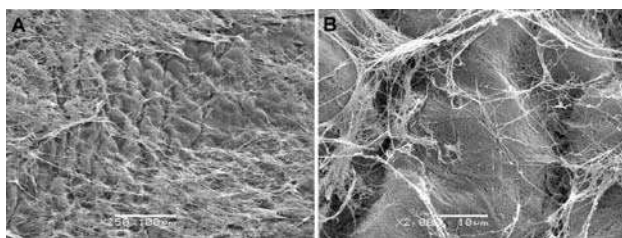


**Figura 7.** Corion visto desde la cara adyacente al amnios. Se observa una gran cantidad de células unidas estrechamente, mientras que las fibras de colágena son escasas (aumentos: A, 250x; B, 2,000x).

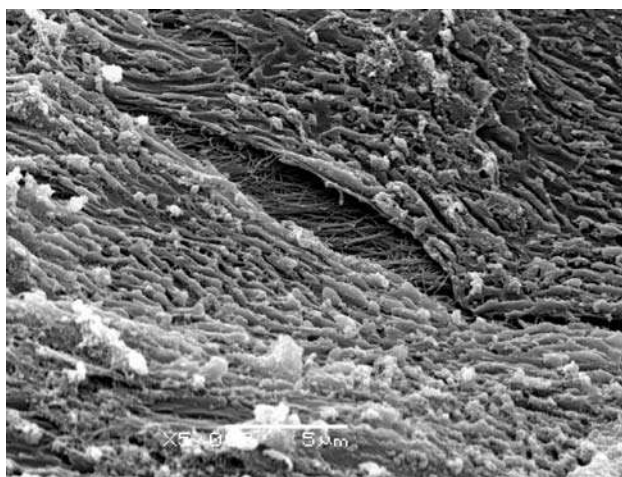


**Figura 8.** Vista frontal de las membranas corioamnióticas desde la cara coriodecidual. Se observa la gran cantidad de células en la coriodecidea y en el centro una zona libre de células donde se distinguen fibras de colágena del amnios (aumento 5,000x).

Estas observaciones comprueban que el corion está formado principalmente por células, y no tiene una estructura importante de tejido conectivo, que pueda proveer de soporte a las membranas corioamnióticas.

La observación de la red tridimensional de tejido conectivo en las membranas, particularmente en el amnios, permite entender el papel central que desempeña la colágena tipo IV en el mantenimiento de la estructura de este tejido y su función de proveer el soporte mecánico para el feto durante la gestación. Es evidente que el principal mecanismo fisiopatológico encargado de disminuir la resistencia de las membranas y llevar a su rotura está mediado, precisamente, por enzimas colagenolíticas, particularmente la colagenasa tipo IV o MMP-9.<sup>9</sup>

## REFERENCIAS

1. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338(10):663-70.
2. Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, et al. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 1993;14(4):385-406.
3. Modesti A, Scarpa S, D'Orazi G, Simonelli L, Caramia FG. Localization of type IV and V collagens in the stroma of human amnion. *Prog Clin Biol Res* 1989;296:459-63.
4. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Karchmer S, et al. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):84-8.
5. Vadillo-Ortega F, Hernández-Miranda A, Bermejo-Martínez L, Beltrán-Montoya J, González-Ávila G. Transición de la forma enzimática latente a activa como un modelo de regulación de la degradación de matriz extracelular en el corioamnios durante el trabajo de parto humano. *Ginecol Obstet Mex* 1995;63:166-72.
6. Zaga V, Estrada-Gutierrez G, Beltrán-Montoya J, et al. Secretions of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depend on initial interactions of amnion or choriodecidea with lipopolysaccharides or group B streptococci. *Biol Reprod* 2004;71(4):1296-302.
7. van Herendael BJ, Oberti C, Brosens I. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol* 1978;131(8):872-80.
8. Vadillo-Ortega F, Hernández-Guerrero C. Fisiopatología de la rotura prematura de membranas. En: L. Cabero Roura D, Saldivar Rodríguez E, Cabrillo Rodríguez, editores. *Obstetricia y medicina materno-fetal*. México: Médica Panamericana, 2007.
9. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005;112 (Suppl 1):19-22.

## Evidencia de que las subpoblaciones de leucocitos periplacentarios al término de la gestación poseen propiedades funcionales relacionadas con la inducción del trabajo de parto\*

Arturo Flores Pliego,\* Jorge Beltrán Montoya,\*\* Nardhy Gómez López,\* Felipe Vadillo Ortega\*

Nivel de evidencia: II-3

### RESUMEN

**Antecedentes:** el aumento de la actividad colagenolítica en las membranas fetales, vinculado con la rotura prematura, se ha relacionado con actividad anormal de las metaloproteasas de matriz extracelular secretadas al espacio extracelular en forma de enzimas inactivas, que deben activarse para degradar selectivamente sus componentes.

**Objetivo:** analizar las propiedades funcionales de las subpoblaciones de leucocitos provenientes de la circulación de la placenta.

**Material y métodos:** estudio biomédico experimental en el que se cultivaron leucocitos de la circulación de la placenta y de sangre periférica durante 96 horas, de mujeres con embarazo a término sin trabajo de parto. Las subpoblaciones de leucocitos fueron inmunotipificadas por citometría de flujo. Los medios del cultivo fueron analizados con zimografía y el perfil de actividad enzimática de los medios se evaluó en presencia de inhibidores de proteasas.

**Resultados:** los leucocitos de la placenta se componen de linfocitos T, NK, B y monocitos, se comprobó aumento progresivo de la secreción de MMP-9 inactiva (92 kDa) y activación de la MMP-9 a una forma de 82 kDa desde las 48 horas. El perfil enzimático mostró predominio de metaloproteasas.

**Conclusiones:** los leucocitos que se encuentran en la sangre de la placenta mostraron capacidades funcionales diferentes a los de la circulación periférica de las embarazadas. Los leucocitos periplacentarios, casi todos linfocitos T, se caracterizan por capacidad específica para secretar y activar MMP-9, enzima que participa en la degradación de las membranas fetales. Esto sugiere que en el entorno de la placenta se reclutan células especializadas en la inducción de cambios relacionados con el trabajo de parto.

**Palabras clave:** placenta, leucocitos, MMP-9.

### ABSTRACT

**Background:** The rise of collagenolytic activity in fetal membranes, associated to premature rupture, have been related to abnormal activity of the extracellular matrix metalloproteinases discharged to the extracellular space as inactive enzymes that have to be activated to selectively degrade its components.

**Objective:** To analyze the functional properties of leukocytes subpopulations coming from the placental circulation.

**Material and methods:** Biomedical experimental study in which placental and outlying blood leukocytes were cultivated during 96 hours, from women with pregnancy to term without labor. Leukocytes subpopulations were stained by flow cytometry. Culture media were analyzed with zymography and enzymatic activity profile was evaluated in presence of proteases inhibitors.

**Results:** Placental leukocytes are composed of T-, NK- and B-lymphocytes, and monocytes; it was documented a progressive increase of inactive MMP-9 secretion (92 kDa), accompanied by an 82 kDa form MMP-9 activation since 48 hours. Enzymatic profile mainly showed metalloproteinases.

**Conclusions:** Placental blood leukocytes showed functional capacities different from those that circulate in pregnant women's outlying circulation. Placental leukocytes, mainly T-lymphocytes, are characterized by the specific capacity to secrete and activate MMP-9; an enzyme that participates in fetal membranes degradation. It suggests that in placental surroundings are recruited cells specialized in labor changes induction.

**Key words:** placenta, leukocytes, MMP-9.

## RÉSUMÉ

**Antécédents** : l'augmentation de l'activité collagène-lytique dans les membranes fœtales, attachée à rupture prématurée, a été liée avec l'activité anormale des métalloprotéases de matrice extracellulaire sécrétées à l'espace extracellulaire sous forme d'enzymes inactives et qui doivent être activées pour dégrader sélectivement leurs composantes.

**Objectif** : faire l'analyse des propriétés fonctionnelles des sous-populations de leucocytes provenant de la circulation du placenta.

**Matériel et méthodes** : étude biomédicale expérimentale dans laquelle on a cultivé des leucocytes de la circulation du placenta et du sang périphérique pendant 96 heures, de femmes avec grossesse à terme sans travail. Les sous-populations de leucocytes ont été identifiées par cytométrie en flux. Les milieux de culture ont été analysés avec zymographie et le profil d'activité enzymatique des milieux a été évalué en présence d'inhibiteurs de protéases.

**Résultats** : les leucocytes du placenta sont composés de lymphocytes T, NK, B et monolithes, on a prouvé augmentation progressive de la sécrétion de MMP-9 inactive (92 kDa) et activation de la MMP-9 à une forme de 82 kDa depuis les 48 heures. Le profil enzymatique a montré prédominance de métalloprotéases.

**Conclusions** : les leucocytes qui se trouvent dans le sang du placenta ont montré des capacités fonctionnelles différentes à ceux de la circulation périphérique des gestantes. Les leucocytes péri placentaires, presque tous lymphocytes T, sont caractérisés par capacité spécifique pour sécréter et activer MMP-9, enzyme qui participe de la dégradation des membranes fœtales. Ceci suggère que dans l'entourage du placenta sont recrutés des cellules spécialisés dans l'induction des changements liés au travail.

**Mots-clés** : placenta, leucocytes, MMP-9.

## RESUMO

**Antecedentes**: O aumento da atividade colagenolítica nas membranas fetais, vinculado com a quebra prematura, está relacionado com a atividade anormal dos metilprotease de matriz extracelular secretadas ao espaço extracelular em forma de enzimas inativas, que se devem ativar para degradar seletivamente seus componentes.

**Objetivo**: Analisar as propriedades funcionais das subpopulações de leucócitos provenientes da circulação da placenta.

**Material e métodos**: Estudo biomédico experimental em que foi cultivado leucócito da circulação da placenta e do sangue periférico durante 96 horas, de mulheres com gravidez em término sem trabalho de parto. As subpopulações de leucócitos foram imunotificadas por citometria de fluxo. Os meios de cultivo foram analisados com cimografia e o perfil de atividade enzimática dos meios foi avaliado com a presença de inibidores de proteases.

**Resultados**: Os leucócitos da placenta compõem-se de linfócitos T, NK, B e monócitos, que se comprovou um aumento progressivo da secreção de MMP-9 inativa (92 kDa) e ativação da MMP-9 a uma forma de 82 kDa desde 48 horas. O perfil enzimático mostrou predomínio de metilprotease.

**Conclusões**: Os leucócitos que se encontram no sangue da placenta mostraram capacidades funcionais diferentes dos da circulação periférica das grávidas. Os leucócitos periplacentários, quase todos linfócitos T, se caracterizam por uma capacidade específica para secretar e ativar MMP-9, enzima que participa na degradação das membranas fetais. Isto sugere que o ambiente da placenta recruta células especializadas na indução de mudanças relacionadas com o trabalho de parto.

**Palavras-chave**: placenta, leucócitos, MMP-9.

- \* Este trabajo obtuvo el tercer lugar del Premio Dr. Eliseo Ramírez otorgado por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia a los trabajos de investigación básica presentados en el 58 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia celebrado en Monterrey, NL, octubre 2007. Se realizó con apoyo del Fondo Sectorial de Salud de CONACyT (Proyecto 7036).

\*\* Dirección de investigación.

\*\*\* Departamento de especialidades médicas.  
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Dr. Felipe Vadillo Ortega. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, Montes Urales 800, colonia Lomas de Virreyes, CP 11000, México, DF. Tel.: 5202-9381. E-mail: fvadillo@servidor.inper.edu.mx

Este artículo debe citarse como: Flores PA, Beltrán MJ, Gómez LN, Vadillo OF. Evidencia de que las subpoblaciones de leucocitos periplacentarios al término de la gestación poseen propiedades funcionales relacionadas con la inducción del trabajo de parto. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):45-51.

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

El parto humano es resultado de múltiples sucesos fisiológicos que incluyen, al menos, la sincronización de las contracciones uterinas, la dilatación cervical y, finalmente, la rotura de las membranas fetales que, en conjunto, permiten el nacimiento del feto. No obstante, es posible que estas membranas se rompan sin los eventos mencionados, lo que se denomina rotura prematura de membranas; es decir, pérdida de continuidad de las membranas fetales con salida de líquido amniótico transvaginal en ausencia de trabajo de parto, y sucede en embarazos de más de 20 semanas.<sup>1</sup> Ésta es un grave problema de salud que condiciona un riesgo que depende directamente de la edad gestacional en que se manifieste y pone en peligro tanto la vida del feto, como la de la madre.<sup>2</sup> La rotura prematura de membranas es causa de la tercera parte

de los nacimientos prematuros que ingresan a terapia intensiva neonatal y la responsable directa de la quinta parte de las muertes de estos neonatos.<sup>3</sup> Su frecuencia en nuestro país es, al menos, del 10%, y en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, su prevalencia es alta porque concentra a población con riesgo elevado (12% de los nacimientos).<sup>4</sup>

Hoy se considera que la etiopatogenia de la rotura prematura es multifactorial y el mecanismo exacto que la desencadena no ha sido completamente esclarecido. El mecanismo molecular relacionado con la rotura prematura supone diversos procesos bioquímicos, como la disminución del contenido de colágena en las membranas fetales,<sup>5</sup> la alteración de su estructura<sup>6</sup> y el incremento en la actividad colagenolítica.<sup>7</sup>

El aumento en la actividad colagenolítica de las membranas fetales que se asocia con rotura prematura se ha relacionado con la actividad anormal de una familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), las cuales son secretadas al espacio extracelular en forma de enzimas inactivas y requieren ser activadas para degradar selectivamente los componentes de la matriz extracelular de las membranas fetales.<sup>8</sup>

Estudios previos han demostrado que tanto en el líquido amniótico como en las células de las membranas fetales, el trofoblasto y las células deciduales, durante el trabajo de parto y la rotura prematura de membranas, algunas MMP se expresan como colagenasa intersticial (MMP-1),<sup>9</sup> estromelisin 1, 2 y 3 (MMP-3, 10 y 11),<sup>10</sup> matrilisina (MMP-7)<sup>11</sup> y principalmente la colagenasa tipo IV de 92 kDa o MMP-9,<sup>12</sup> una enzima que se expresa de manera selectiva hacia el final de la gestación, por lo que se propone como un marcador bioquímico del evento de rotura.<sup>7</sup>

Hay datos de que otra fuente de la MMP-9 son las células inflamatorias y, dado que durante el trabajo de parto existe infiltrado de leucocitos en los tejidos gestacionales,<sup>13</sup> diferentes células inmunológicas podrían desempeñar un papel importante como fuente de señales y mediadores que activan la degradación de la matriz extracelular de las membranas fetales, lo que contribuye a la creación de un microambiente de colagenolisis durante el trabajo de parto.<sup>14</sup>

En este estudio se analizan las propiedades funcionales de las subpoblaciones de leucocitos de la

circulación proveniente de la placenta y la producción en cultivo de pro MMP-9 y su activación por estas células inmunológicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras biológicas

Las muestras empleadas para este estudio se obtuvieron en el Departamento de Tococirugía del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, inmediatamente después del alumbramiento de mujeres con embarazo a término (37 a 40 semanas de gestación) sin trabajo de parto y con indicación de cesárea sin datos clínicos, ni microbiológicos de infección, ni enfermedad. Las placentas se transportaron al laboratorio en condiciones de estricta esterilidad para su procesamiento.

### Aislamiento de leucocitos

Se obtuvieron muestras de sangre de las mujeres estudiadas, que se colectaron mediante drenado de los cotiledones de la placenta, con lo que se obtuvo una muestra representativa de los leucocitos que circulaban localmente *in vivo*. Además, y con fines de comparación, se obtuvieron 10 mL de sangre periférica que fue recolectada en tubos heparinizados (vacutainer-heparina sódica, Becton-Dickinson, Rutherford, NJ). Las muestras de sangre se sometieron a un gradiente de densidad con el reactivo Lymphoprep® (Axis-Shield, Oslo, Noruega), para obtener los leucocitos de acuerdo con el protocolo sugerido por los fabricantes.

Una vez obtenidos los leucocitos, se contaron y se midió su viabilidad mediante el colorante vital azul tripano. Algunas células se procesaron para citometría de flujo y otras se destinaron a cultivo.

### Cultivo de leucocitos

Los cultivos se hicieron con  $1 \times 10^5$  leucocitos provenientes de la placenta o circulación periférica. Las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pozos con 1 mL de medio RPMI 1640 complementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA). Las células se mantuvieron en una estufa de cultivo a 37°C, con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire, con humedad relativa del 80% durante 24 horas. Al término de este tiempo se

les substituyó el medio por DMEM complementado con hidrolizado de lactoalbúmina al 1%, antibiótico-antimicótico al 1% y piruvato de sodio al 1%, y se cultivaron en las condiciones mencionadas durante 24, 48, 72 y 96 horas. Al término de cada uno de los tiempos de cocultivo se colectó el medio condicionado y se almacenó a -70 °C para su posterior análisis.

#### **Tinción inmunofluorescente para antígenos de superficie**

Para la caracterización inmunofenotípica de las células provenientes de la placenta y la detección de las distintas subpoblaciones de leucocitos se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos: anti CD45-FITC; anti CD3-PC7; anti CD14-ECD; anti CD56-PE y anti CD19-PC5 (Beckman Coulter, Inc.), para identificar leucocitos, linfocitos T, monocitos, células NK y linfocitos B, respectivamente.

Las muestras se analizaron con citometría de flujo en un equipo de la serie CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Inc.), y el análisis de los datos se hizo con ayuda del software CXP.

#### **Zimografía en gelatina**

La actividad gelatinolítica de los medios condicionados del cultivo se detectó mediante geles/sustrato. Alícuotas de 5 µg de proteína de cada uno de los medios se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con dodecil sulfato de sodio (SDS) copolimerizados con gelatina tipo A de piel porcina (Sigma, St. Louis, MO, USA) al 1% en condiciones no desnaturizantes,<sup>7,15</sup> mediante el uso de un sistema con formato de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA). Las zonas de actividad enzimática aparecieron como bandas de lisis claras contra un fondo de sustrato no degradado. En cada corrida se incluyeron marcadores de actividad para MMP-2 y MMP-9 con el uso de sobrenadante obtenido de la línea celular de promielocitos U937.<sup>16</sup> Las bandas obtenidas se analizaron con densitometría mediante analizador de imágenes (UVP, Southern, CA, USA) y se expresaron como actividad por área.

#### **Perfil de proteasas en los medios de cultivo**

Se colectaron alícuotas de 5 µg de los medios condicionados del cultivo celular de 72 horas, que tuvieron

la mayor cantidad de MMP-9 en forma activa, e incubaron durante dos horas a 37 °C con inhibidores específicos de familias de proteasas que incluyeron: ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 5 mM para proteasas dependientes de iones metal; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM para proteasas de serina, y N-etilmaleimida (NEM), 2 mM para proteasas con residuos de cisteína. Los medios condicionados se incubaron con 500 µg de azocaseína (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) y se llevó a 1 mL con amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.8. La mezcla se incubó durante 24 horas a 37°C con agitación constante. La azocaseína no digerida se precipitó con 200 µL de ácido tricloroacético en frío, después de 30 minutos se centrifugó a 12,000 rpm x g durante cinco minutos. Los valores de absorbancia de los sobrenadantes se leyeron a 336 nm mediante un espectrofotómetro (DU-800, Beckman, USA). La actividad se expresó como µg de azocaseína degradada/mg de proteína incubada.

#### **Análisis estadístico**

El cambio en la cantidad y actividad enzimática de la MMP-9 y en las distintas familias de proteasas se analizó mediante análisis de variancia (ANOVA) y se expresó como el promedio ± desviación estándar previo a un análisis de normalidad de los datos en cuestión. El valor de  $p \leq 0.05$  se consideró significativo en cada caso.

## **RESULTADOS**

La citometría de flujo de los leucocitos provenientes de la placenta mostró que esta población celular se compone, en su mayor parte, de subpoblaciones de linfocitos T (73.5% del total de la población celular), monocitos (16.2%), células NK (6%) y linfocitos B (4.2%). Estos resultados se encuentran dentro del rango descrito para nuestro laboratorio.<sup>17</sup>

Durante el análisis de la actividad gelatinolítica de los sobrenadantes del medio condicionado del cultivo de leucocitos provenientes de la placenta y leucocitos de la circulación periférica a las 24, 48, 72 y 96 horas, el ensayo mostró que a las 24 horas los leucocitos placentarios secretan, mayoritariamente, MMP-9 inactiva (92 kDa) ( $1,917.37 \pm 318.03$ , actividad por área), la cual aumenta su intensidad relativa a las

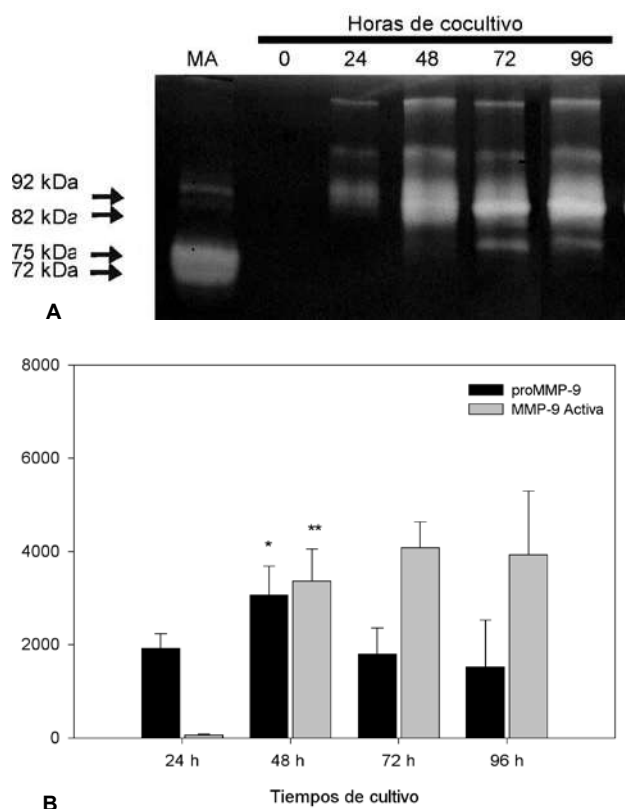


**Figura 1.** Zimografía en gelatina. A. Los medios del cultivo celular de leucocitos placentarios ( $n = 7$ ) se analizaron mediante zimografía con gelatina, y mostraron la generación de dos especies de gelatinasas de diferente peso molecular formadas a lo largo del cultivo pro MMP-9 (92kDa) inactiva y MMP-9 activa (86 kDa), de acuerdo con el patrón de migración del marcador de actividad (MA). B. Análisis densitométrico de las MMP-9 inactiva (92kDa) y activa (86 kDa). La actividad gelatinolítica de los medios de cultivo durante el periodo experimental ( $n = 7$ ,  $*p = 0.01$ ,  $**p = 0.001$ ) que fue comprobada mediante zimografía, se analizó con densitometría de bandas de las bandas de lisis y se expresó como actividad por área.

48 horas ( $3,059.3271 \pm 621.46$ , actividad por área;  $p < 0.05$ ). Este aumento a las 48 horas se acompañó de la aparición de una banda de lisis correspondiente a una especie de MMP-9 de menor peso molecular (82 kDa), que corresponde a la MMP-9 activa ( $3,366.03 \pm 685.04$ , actividad por área;  $p < 0.05$ ). La banda de actividad que correspondió a la forma activa de la enzima disminuyó a partir de las 72 horas y, en cambio, se comprobó aumento de la intensidad relativa de la MMP-9 activa, relación que se mantuvo hasta las 96 horas del cultivo. La disminución en la intensidad de la enzima inactiva correlaciona con la conversión a MMP-9 activa, lo que sugiere que la enzima inactiva

que se secreta al medio de cultivo es activada por factores secretados por el mismo cultivo (figura 1 A y B). Todo esto en contraste con lo que secreta el cultivo de leucocitos provenientes de la sangre periférica, sin cambios estadísticamente significativos en la cantidad de MMP-9 inactiva secretada; además, estas células no pudieron generar formas activas de MMP-9 a lo largo de todo el cultivo (figura 2 A y B). Los pesos moleculares de las bandas de lisis se calcularon de acuerdo con la migración relativa del U937 (MA).

Se ensayó la actividad de diferentes familias de proteasas secretadas a los medios condicionados por el cocultivo. La actividad basal de los medios de cultivo de 96 horas, que fueron los que mostraron la mayor cantidad de enzima activa, fue de  $0.1005 \pm 0.0069$  mg de sustrato degradado/mg de proteína incubada. Cuando las muestras se trataron con los diferentes inhibidores se obtuvieron los valores y porcentajes de inhibición mostrados en el cuadro 1. La menor actividad enzimática se obtuvo cuando los medios de cocultivo se trataron con EDTA. Una proporción menor de inhibición se obtuvo con el PMSF, que sugiere la participación de proteasas de serina. La fracción minoritaria correspondió a las proteasas de cisteína.

## DISCUSIÓN

Diversos estudios muestran que las membranas fetales secretan diferentes mediadores involucrados en la degradación de su tejido conectivo,<sup>18</sup> también se ha demostrado que diferentes tipos de leucocitos que arriban a los tejidos gestacionales en el tercer trimestre del embarazo producen estos mediadores. Debido a que las membranas fetales son tejidos que carecen de vasos sanguíneos, el origen de los leucocitos que las infiltran debe ser el líquido amniótico o la circulación placentaria, la cual representa su entorno más cercano. Los leucocitos son capaces de producir citocinas y otras moléculas efectoras, como la MMP-9, enzima que se ha implicado en el proceso de rotura de las membranas fetales porque puede degradar colágeno tipo IV, fibronectina y proteoglicanos. Por esto, en este trabajo se inició la caracterización de las subpoblaciones de leucocitos que circulan en la placenta y se demostró que estas células tienen características funcionales peculiares, que no se encuentran en células equiva-

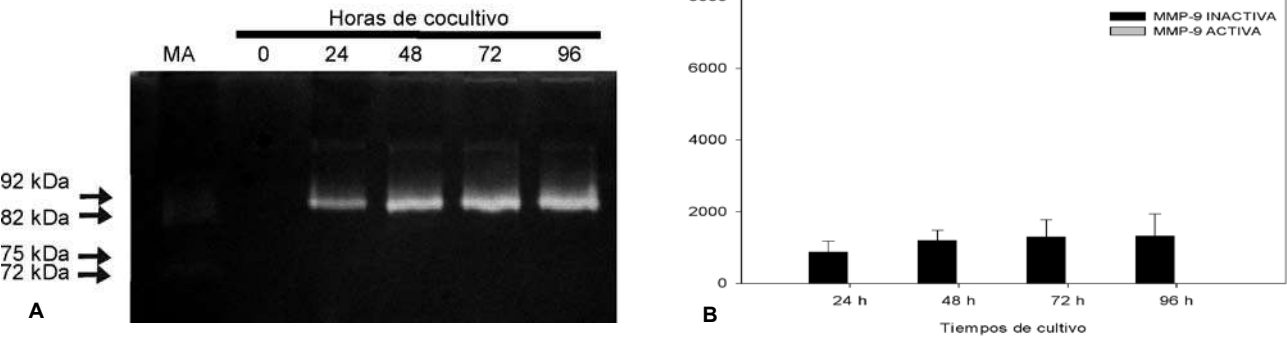


**Figura 2.** Zimografía en gelatina. A. Los medios del cultivo celular de leucocitos de la circulación periférica de embarazadas ( $n = 7$ ) se analizaron mediante zimografía en gelatina, y mostraron una banda de lisis durante todo el tiempo de cultivo, misma que correspondió a la MMP-9 inactiva (92 kDa) de acuerdo con el patrón de migración del marcador de actividad empleado (MA). B. Análisis densitométrico de la MMP-9 inactiva (92 kDa). La actividad gelatinolítica obtenida de los medios condicionados durante todo el cultivo ( $n = 7$ ) que se obtuvo por zimografía se analizó mediante densitometrías de las bandas de lisis y fue expresada como actividad por área.

lentes aisladas de la misma embarazada, pero sí en la circulación general. El hallazgo más notable señala que la cinética de secreción de MMP-9 por los leucocitos provenientes de la placenta se caracteriza por tener sólo la forma inactiva de la enzima en las primeras 24 horas. En las siguientes horas se incrementa progresivamente la secreción de la enzima, pero a partir de las 48 horas de cultivo hay aumento significativo de una especie de MMP-9 de 82 kDa, descrita en la bibliografía como la forma activa de la enzima.<sup>19</sup> La transición del estado de enzima inactiva a activa continuó hasta las 96 horas de cultivo y se acompañó de disminución progresiva de la forma inactiva, de manera que al final del cultivo predominó la forma activa.

La aparición de la especie activa de MMP-9 (82 kDa) en cualquier sistema biológico es un suceso que ocurre sólo cuando se secretan los activadores específicos, que corresponden a diferentes proteasas con afinidad por la pro MMP-9. Esto significa que los leucocitos aislados de la placenta de embarazos a término expresan en cultivo no sólo la MMP-9, sino los activadores necesarios para darle función biológica. Son escasas las descripciones bibliográficas de las proteasas que realizan esta función *in vivo* y hasta el momento ninguna puede relacionarse con el sistema de las membranas fetales. Lo más llamativo de este hallazgo es que los leucocitos aislados de la sangre periférica de estas mismas mujeres no fueron capaces de incrementar la secreción de MMP-9 y en ningún momento se demostró su capacidad para activarla.

En este sentido, se observó que los leucocitos mononucleares de la sangre del entorno coriodecidual no son distintos fenotípicamente de los que se encuentran en la circulación periférica; sin embargo, los primeros tienen características funcionales diferentes que consisten en el aumento progresivo de la secreción de MMP-9 y la activación de la MMP-9 inactiva. Otros autores que han explorado la expresión de la MMP-9 en estos tejidos sólo fueron capaces de demostrar la forma inactiva de la enzima (92 kDa),<sup>20</sup> lo que es motivo de controversia, ya que la enzima necesariamente debe encontrarse en forma activa para poder ejercer su función.

Nuestro hallazgo comprueba la existencia de un mecanismo para reclutar células inmunológicas del entorno de la placenta y de las membranas fetales. Hallazgos complementarios en nuestro laboratorio señalan que estas mismas células pueden localizarse en el microambiente coriodecidual y con ello participar

**Cuadro 1.** Inhibidores específicos de clase de las proteasas

| Inhibidor | $\mu\text{g}$ de sustrato degradado/mg de proteína incubada | % de inhibición |
|-----------|-------------------------------------------------------------|-----------------|
| EDTA      | $0.019 \pm 0.0041$                                          | 80.06           |
| PMSF      | $0.094 \pm 0.0149$                                          | 6.6             |
| NEM       | $0.105 \pm 0.0033$                                          | 1.2             |

El cuadro muestra las diferentes actividades y porcentajes de inhibición de cada una de las diferentes familias de proteasas contenidas en los medios de cultivo ( $n = 4$ ).

de manera directa en el control de la degradación del tejido conectivo de estas estructuras.<sup>21</sup>

El análisis bioquímico mediante inhibidores específicos de proteinasas confirmó que las proteasas secretadas por los leucocitos de la placenta son, en su mayor parte, metaloproteasas, como las diferentes MMP, ya que el mayor porcentaje de inhibición se obtuvo al tratar los medios del cultivo de dichas células con EDTA, inhibidor de metaloproteasas.

## CONCLUSIÓN

La placenta y sus tejidos anexos son capaces de reclutar poblaciones específicas de leucocitos o, bien, de condicionar a las subpoblaciones locales a mostrar capacidades funcionales específicas, como las mostradas en este trabajo, y que corresponden de manera directa con la inducción de la degradación del tejido conectivo de las membranas fetales. Con ello, se logra contar con células susceptibles de regulación que expresan mediadores conocidos del trabajo de parto. Ante estas pruebas experimentales es necesario que los estudios sucesivos se enfoquen a caracterizar el tipo de células específicas que participan en este fenómeno de secreción y activación de la MMP-9.

## REFERENCIAS

1. Normas y Procedimientos de Ginecología y Obstetricia. Instituto Nacional de Perinatología, 2002.
2. Mercer BM. Preterm premature rupture of the membranes. *Obstet Gynecol* 2003;101(1):178-93.
3. Beltrán MJ, Enríquez PMM. Asistencia actual en la rotura prematura de membranas. En: *Prematurez, un enfoque perinatal*. México: ETM, 2004;pp:118-27.
4. Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Anuario estadístico 2000.
5. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, et al. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 1990;75(1):84-88.
6. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101(5):375-86.
7. Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146(1):148-56.
8. Murphy G, Stanton H, Cowell S, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999;107(1):38-44.
9. Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(4):914-20.
10. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol* 1999; 94(3):435-40.
11. Maymon E, Romero R, Pacora P. Matrilysin (matrix metalloproteinase 7) in parturition, premature rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(6):1545-53.
12. McLaren J, Taylor DJ, Bell SC. Increased concentration of pro-matrix metalloproteinase 9 in term fetal membranes overlying the cervix before: implications for membrane remodeling and rupture. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(2):409-16.
13. Thomson JA, Telfer JF, Young A, et al. Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Human Reprod* 1999;14(1):229-36.
14. Osman I, Young A, Ledingham MA, et al. Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term. *Mol Hum Reprod* 2003;9(1):41-5.
15. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218(2):325-9.
16. Watanabe H, Nakanishi I, Yamashita K, Hayakawa T, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase) from U937 monoblastoid cells: correlation with cellular invasion. *J Cell Sci* 1993;104(Pt 4):991-9.
17. Vega-Sánchez R, Estrada-Gutiérrez G, Cérbullo Vazquéz A, Beltrán-Montoya J, Vadillo-Ortega F. Caracterización del espacio coriodecidual como un microambiente rico en moléculas efectoras que inducen la rotura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto. *Ginecol Obstet Mex* 2004;72:593-601.
18. Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1353-61.
19. Shapiro SD, Fliszar CJ, Broekelmann TJ, et al. Activation of the 92-kDa gelatinase by stromelysin and 4-aminophenylmercuric acetate. Differential processing and stabilization of the carboxyl-terminal domain by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem* 1995;270(11):6351-6.
20. Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod* 2003;9(6):367-73.
21. Estrada-Gutierrez G, Zaga V, Gonzalez-Jimenez MA, et al. Initial characterization of the microenvironment that regulates connective tissue degradation in amniochorion during normal human labor. *Matrix Biol* 2005;24(4):306-12.

## Descripción de los elementos biológicos implicados en el inicio de un nuevo organismo. Revisión de investigaciones contemporáneas sobre el desarrollo embrionario temprano

Alejandra Huerta Zepeda,\* María Elena Torres Padilla,\*\* Rodrigo Guerra López\*\*\*

### RESUMEN

El desarrollo embrionario de los mamíferos comienza con la fertilización de un ovocito maduro por un espermatozoide. Las células germinales atraviesan una serie de procesos, incluida la gametogénesis: a) origen de las células germinales y su migración hacia las gónadas, b) aumento en número de las células germinales por mitosis, c) reducción del número de cromosomas por meiosis, y d) maduración estructural y funcional de los ovocitos y espermatozoides. Cuando están capacitadas o maduras, los gametos se liberan de las gónadas y se transportan al oviducto, donde normalmente se realiza la fertilización. En el ovocito fertilizado (cigoto) comienza la transición-maternal-cigoto, que incluye la degradación de los transcritos maternos, reemplazados por los transcritos del cigoto, por la activación del genoma del cigoto. Simultáneamente, el material nuclear del espermatozoide y del ovocito sufre una serie de cambios que forman los pronúcleos masculino y femenino. Esta serie de cambios incluye el reemplazo de las protaminas que empaquetan el material genético masculino por histonas. Después de la fertilización, los gametos se reorganizan epigenéticamente, lo que implica cambios en la cromatina y metilación del ADN; esta reprogramación se extiende al estadio de blastocisto. Las modificaciones covalentes de las histonas y la metilación del ADN se consideran las marcas epigenéticas más importantes en el desarrollo del embrión preimplantado. Finalmente, en el cigoto se distinguen los polos animal-vegetal por la expulsión del cuerpo polar. Luego sufre una serie de divisiones que originan al blastocisto, donde se distingue el eje embrionario-abembrionario, para enseguida entrar al útero previamente preparado para la implantación.

**Palabras clave:** desarrollo embrionario, células germinales, reprogramación epigenética, fertilización, cigoto, blastocisto.

### ABSTRACT

The development of the mammalian embryo begins with the fertilization of the mature oocyte by the sperm. However, many processes that lead to the production of functional gametes precede this event. First of all, both male and female germ cells form during gametogenesis. The gametogenesis comprises four different steps: a) the specification and migration of primordial germ cells, b) the increase in the number of germ cells through mitotic divisions, c) the reduction in chromosomal number through meiosis, and d) a final structural and functional maturation of the oocyte and the sperm. Once the oocyte and the sperm have matured, the newly formed gametes are released from the gonads upon the appropriate hormonal stimulus and are subsequently transported to the oviduct, where the oocyte awaits to be fertilized by the sperm. The fertilized oocyte, now called zygote, undergoes the maternal-to-zygotic transition, characterized by the degradation of maternal transcripts and the concomitant synthesis of transcripts by the newly formed zygote. The production of these new transcripts is the result of the genome activation of the zygote. At the same time, the sperm and egg's chromatin experience a series of changes that will result in the formation of the male and female pronuclei. In the male pronucleus an exchange of protamines for histones takes place. Furthermore, the parental genomes are subject to modification through DNA demethylation, and the proteins, around which the DNA is 'packed', the histones, are also subject to covalent modifications. These modifications constitute some of the most prominent changes involved in the epigenetic reprogramming of the two gametes. Finally, the animal-vegetal poles that will begin the first divisions or 'cleavage' to give rise to the blastocyst, where we can already distinguish an embryonic-abembryonic axis. The blastocyst will then implant in the uterus previously prepared for implantation.

**Key words:** embryonic development, germ cells, epigenetic reprogramming, fertilization, zygote, blastocyst.

### RÉSUMÉ

Le développement embryonnaire des mammifères commence avec la fertilisation d'un ovocyte mûr par un spermatozoïde. Les cellules germinales traversent une série de procès, la gamétogenèse inclut : a) origine des cellules germinales et leur migration vers les gonades, b) augmentation en nombre des cellules germinales par mitose, c) réduction du nombre de chromosomes par méiose, et d) maturation structurelle et fonctionnelle des ovocytes et spermatozoides. Lorsqu'ils sont capités ou mûrs, les gamètes se libèrent des gonades et sont transportés vers l'oviducte, où la fécondation est normalement réalisée. Dans l'ovocyte fertilisé (zygote) commence la transition

maternelle au zygote, qui comporte la dégradation des transcrits maternels, remplacés par les transcrits du zygote, par l'activation du génome du zygote. Simultanément, le matériel nucléaire du spermatozoïde et de l'ovocyte subit une série de changements qui forment les pronucléus masculin et féminin. Cette série de changements comporte le remplacement des protamines qui contiennent le matériel génétique masculin par des histones. Après la fertilisation, les gamètes se réorganisent épigénétiquement, ce qui implique des changements dans la chromatine et méthylation de l'ADN ; cette reprogrammation s'étend au stade blastocyste. Les modifications covalentes des histones et la méthylation de l'ADN sont considérées les marques épigénétiques les plus importantes dans le développement de l'embryon pré implanté. Finalement, dans le zygote on distingue les pôles animal-végétal par l'expulsion du corps polaire. Puis il subit une série de divisions qui donnent origine au blastocyste, où se distingue l'axe embryonnaire-abembryonnaire, pour ensuite entrer dans l'utérus préalablement préparé pour l'implantation.

**Mots-clés** : développement embryonnaire, cellules germinales, reprogrammation épigénétique, fertilisation, zygote, blastocyste.

## RESUMO

O desenvolvimento embrionário dos mamíferos começa com a fertilização de um ovócito maduro com um espermatozóide. As células germinais atravessam uma série de processos, incluindo a gametogênese: a) origem das células germinais e sua migração até as gônadas, b) aumento do número das células germinais por mitoses, c) redução do número de cromossomos por meiose, e d) maturação estrutural e funcional dos ovócitos e espermatozoides. Quando já estão capacitados ou maduros, os gametas se liberam das gônadas e se transportam ao oviduto, onde normalmente se realiza a fertilização. No óvulo fertilizado (zigoto) começa a transição-materna-ao-zigoto, que inclui a degradação dos transcritos maternos, substituídos pelos transcritos do zigoto, pela ativação do genoma do zigoto. Simultaneamente, o material nuclear do espermatozóide e do ovócito sofre uma série de mudanças que formam os pronúcleos masculino e feminino. Esta série de mudanças inclui a substituição das protaminas que empacotam o material genético masculino por histonas. Depois da fertilização, os gametas se reorganizam epigeneticamente, o que implica mudança na cromatina e metilação do DNA; esta reprogramação se estende ao estágio de blastócisto. As modificações covalentes dos histonas e a metilação do DNA se consideram marcas epigenéticas mais importantes no desenvolvimento do embrião pré implantado. Finalmente, no zigoto se distinguem os polos animal-vegetal pela expulsão do corpo polar. Logo sofre uma série de divisões que originam ao blastócisto, onde se distingue o caminho embrionário-abembrionário, para em seguida entrar ao útero previamente preparado para a implantação.

**Palavras-chave**: desenvolvimento embrionário, células germinais, reprogramação epigenética, fertilização, zigoto e blastócisto.

Enseguida se exponen algunos elementos fundamentales que hoy ofrece la biología del desarrollo para comprender y explicar la embriogénesis en los mamíferos, donde el ratón es el modelo experimental por excelencia. Muchas obras de embriología han explicado este proceso continuo. Sin embargo, hoy existen nuevos datos que permiten

analizar con mayor certeza la continuidad y el carácter individual e irrepitable del nuevo organismo que surge tras la fertilización. Aquí nos limitamos a la descripción de los elementos biológicos implicados y dejamos para investigaciones futuras la interpretación biofilosófica de los mismos y las eventuales consecuencias de estos hallazgos para la comprensión de la vida humana naciente.

- \* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- \*\* Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et cellulaire (IGBMC), CU de Strasbourg, France.
- \*\*\* Centro Karol Wojtyla para la investigación social avanzada, Querétaro, Qro., México.

Correspondencia: Dra. Alejandra Huerta Zepeda. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, CP 04510. México, DF. Tel.: +52 (55) 5622 92 21, E-mail: ahuertaz@yahoo.com  
Recibido: noviembre, 2007. Aceptado: noviembre, 2007.

Este artículo debe citarse como: Huerta ZA, Torres PME, Guerra LR. Descripción de los elementos biológicos implicados en el inicio de un nuevo organismo. Revisión de investigaciones contemporáneas sobre el desarrollo embrionario temprano. Ginecol Obstet Mex 2008;76(1):52-64.

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

## CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

La espermatogénesis y la ovogénesis se han estudiado ampliamente durante muchos años, no así el origen del linaje de las células germinales primordiales (*primordial germ cells*, PGC), su papel emergente y su destino, quizá porque se parte de la idea que estas células contienen la misma información genética del organismo que las produce y porque además su estudio es técnicamente difícil.

Las células germinales primordiales son las precursoras de las células germinales o células sexuales, reconocidas como células altamente especializadas, de quienes depende la existencia de descendencia.

Estas células se desarrollarán en espermátocitos u ovocitos. En todos los mamíferos las células germinales primordiales juegan un papel muy importante y único en la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente.

Durante la especificación de las células germinales primordiales la metilación del ADN se pierde, lo que trae consigo un cambio en la información epigenética que da como resultado una nueva programación epigenética (reprogramación). La reprogramación es sustancialmente regulada por factores como la metilación del ADN y la modificación de las histonas que se unen a la cromatina (figura 1).<sup>1,2</sup>

En un embrión de aproximadamente 7.5 días post-fertilización, las células germinales primordiales se localizan en pequeños racimos (25-40) en la pared del saco vitelino, en la base del alantoides, cerca de la inserción del futuro cordón umbilical; es decir, en la región extraembrionaria (figura 2).<sup>3</sup>

Cuando se han especificado y desarrollado, las células germinales empiezan a migrar fuera de la cordillera genital, hacia las gónadas primordiales del embrión. Se pueden identificar, principalmente, por su alta actividad de fosfatasa alcalina y por la expresión de genes específicos implicados en la manutención de la pluripotencialidad. Las células germinales son las únicas células que sufren divisiones meióticas durante su diferenciación.

Durante el curso de su migración, estas células precursoras ya se han diferenciado en células germinales

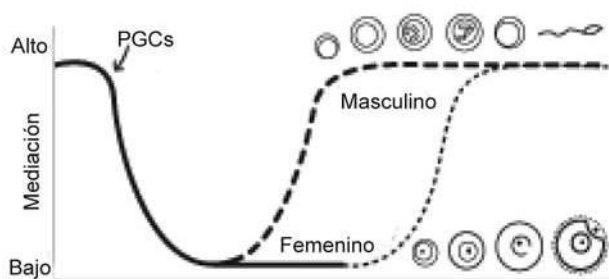


**Figura 1.** Reprogramación de las células germinales. Las células germinales primordiales sufren una demetilación en el desarrollo muy temprano. Posteriormente hay una remetilación en las células germinales masculinas: se inicia en la espermatogonia y en las células germinales femeninas después del nacimiento. Figura modificada de Reik W, 2001.

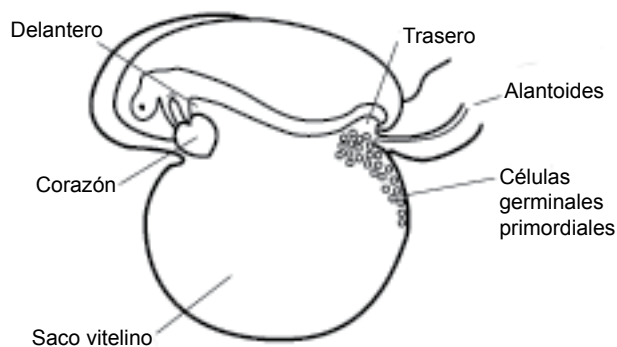


**Figura 2.** Origen y migración de las células germinales. Las células germinales primordiales se observan en la pared del saco vitelino, en la base del alantoides.

(*germ cells*, GC) y empiezan una fase rápida de proliferación mitótica una vez que han llegado a las gónadas. En cada división mitótica las células germinales producen dos células diploides genéticamente iguales. A través de varias divisiones iguales, el número de células germinales aumenta con rapidez. El patrón de proliferación mitótica difiere marcadamente entre las células masculinas y femeninas. Otra diferencia entre las células germinales masculinas y las femeninas es que las células germinales femeninas quedan arrestadas en profase de la meiosis I hasta la pubertad y cesan su actividad después de la menopausia. En cambio, las células germinales masculinas entran a un arresto mitótico en el estadio de células seminales espermatogónicas en los túbulos seminíferos; este arresto se reanuda en respuesta a la estimulación de las hormonas gonadotrópicas que ocurre en la pubertad y las divisiones se prolongarán a lo largo de toda la vida (figura 3).

En los gametos femeninos, la diferenciación incluye la síntesis y almacenamiento de muy variadas moléculas, ARN mensajeros, factores de transcripción u otras moléculas conocidas como factores maternos y que son necesarias para las fases iniciales del desarrollo temprano de un embrión. En los gametos masculinos, la diferenciación incluye un alto grado de compactación de la cromatina, que implica la síntesis de protaminas, que son pequeñas proteínas ricas en arginina y cisteína con alta afinidad por el ADN.

En condiciones patológicas, las células germinales primordiales que no entraron en las gónadas primordiales pueden originar tumores en el transcurso de la

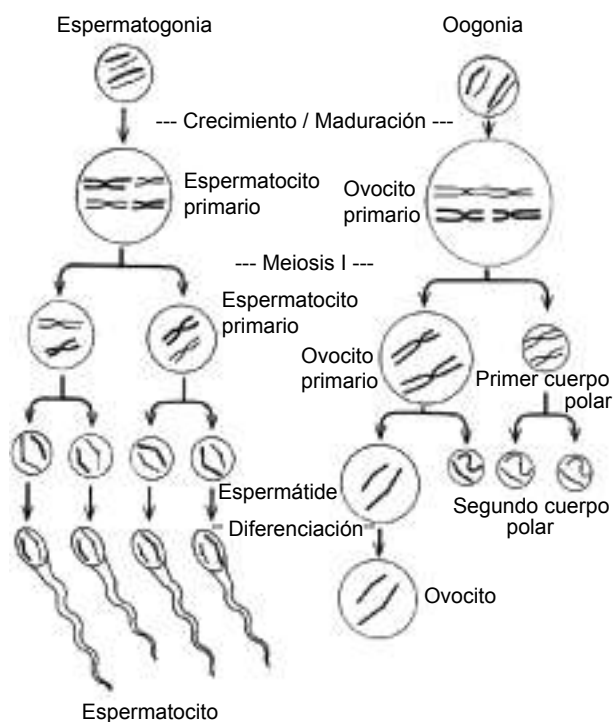


**Figura 3.** Esquema de los pasos que ocurren durante la primera y segunda división meiótica. La célula germinal primaria femenina (ovocito primario) produce una célula (ovocito secundario) y un cuerpo polar o célula pequeña. En la segunda división meiótica madura una célula (ovocito maduro) y el segundo cuerpo polar. La célula germinal primaria masculina (espermatocito primario) produce dos espermatocitos secundarios, que a su vez originan cuatro espermátides (cada uno se convierte en espermatozoide que en el trayecto del útero será capacitado).

vida o sufrir mutaciones que provocan aberraciones en la diferenciación de las células germinales, que eventualmente conducen hacia la infertilidad.

## FERTILIZACIÓN

Con la fertilización se inician numerosos y complejos cambios, que incluyen diversos procesos celulares en el cigoto resultante; es decir, en el ovocito fertilizado y en la cromatina derivada del espermatozoide.

El ovocito detenido en la profase meiótica I contiene el núcleo en el centro. Con el reinicio de la meiosis, durante la maduración del ovocito, se forma el huso meiótico. Éste se va desplazando hacia la corteza, que se enriquece de actina y forma microvellosidades en la membrana. Cuando el huso alcanza la zona cortical, se

completa la metafase I y se expulsa el primer cuerpo polar. El resultado es el ovocito maduro arrestado en metafase II. En esta fase, el ovocito maduro puede ser fertilizado. Cuando en el ovocito fertilizado penetra el espermatozoide, empieza el proceso de expulsión del segundo cuerpo polar, con lo que se completa la segunda división meiótica. En los instantes que siguen a la fertilización, el pronúcleo femenino se localizará cerca del cuerpo polar. Posteriormente, ambos pronúcleos migran hacia el centro del cigoto que se acaba de formar.

En el cigoto, es decir, el embrión de una célula, el pronúcleo masculino está enriquecido de proteínas, como los factores de transcripción Spl, TBP, ets-114 que inicialmente no posee el pronúcleo femenino. Esto se refleja en mayor actividad transcripcional en la cromatina masculina: la expresión de genes en el pronúcleo masculino es significativamente más alta que en el femenino. El pronúcleo masculino no sólo comienza la transcripción antes que (e independientemente de) el pronúcleo femenino, sino también la replicación. Estos eventos reflejan probablemente diferencias en la estructura de la cromatina paterna y materna, debido quizá, entre otras cosas, al intercambio que debe sufrir el pronúcleo masculino de protaminas a histonas (figura 4). Se ha propuesto que durante el intercambio protaminas-histonas que sigue a la fertilización, los factores transcripcionales maternos podrían “ganar tiempo” para acceder al ADN que comprende las secuencias reguladoras de genes antes de que sean secuestradas al nucleosoma. El intercambio protaminas-histonas se inicia muy pronto después de la fertilización y es completado mucho antes de la replicación del ADN.<sup>4</sup>

Entre los cambios epigenéticos a los que están sujetos los pronúcleos está la desmetilación del ADN, que se da en diferentes fases y a diferentes grados, produciendo una asimetría en ambos pronúcleos: mientras el pronúcleo femenino guarda globalmente las marcas de metilación del ADN, el pronúcleo masculino está sujeto a una desmetilación activa, a la que sólo escapan los genes que se regulan por estampado. Es probable que esta asimetría epigenética tenga efectos importantes sobre la diferenciación del embrión. Por ejemplo, en los embriones clonados resultado de la transferencia de un núcleo celular somático, esta

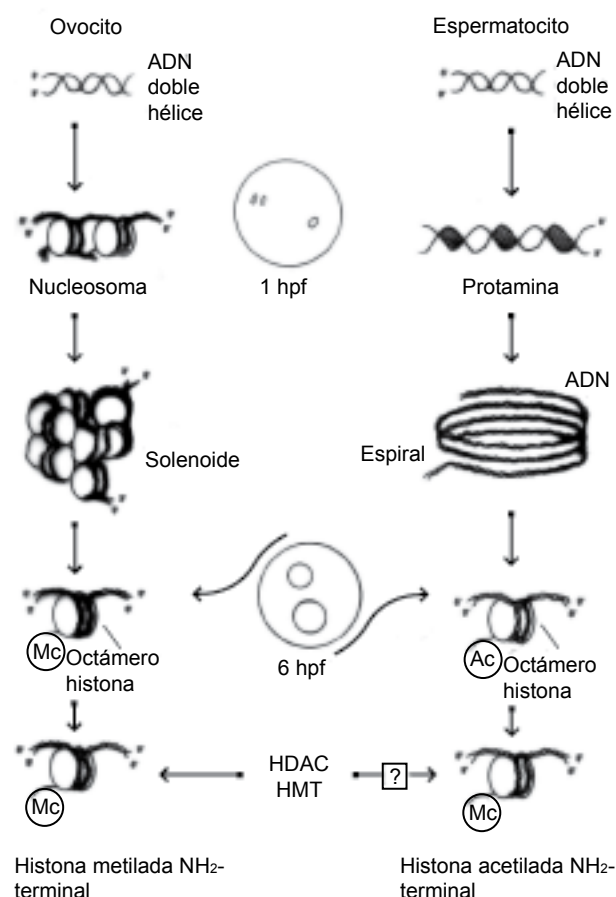


**Figura 4.** Asimetría epigenética de la cromatina en el cigoto después de la fertilización. En la fertilización, los gametos femeninos y masculinos están en diferentes fases de la maduración meiótica. El gameto femenino se encuentra arrestado, o detenido, en metafase de la segunda división meiótica (MII) en espera de la señal para completar la meiosis. En el pronúcleo femenino, las histonas se encuentran metiladas en la región amino-terminal. En el pronúcleo masculino se encuentra acomplejado en una configuración toroidal única, debido a la presencia de protaminas. El pronúcleo masculino debe sufrir descondensación e intercambio de protaminas a histonas. Durante este periodo, las histonas sufren cambios de acetilación y desacetilación (a través de enzimas específicas llamadas histonas acetiltransferasas -HAT- y deacetilasas -HDAC-, respectivamente); y metilación (a través de histonas metiltransferasas específicas (HMTs)).

asimetría epigenética no existe, y los embriones resultantes de la clonación muestran defectos durante el desarrollo más tardío, particularmente en el de los tejidos embrionarios o extraembrionarios.<sup>5</sup> La reprogramación de los genomas parentales continúa durante las primeras divisiones celulares. Posterior-

mente, en el estadio de blastocisto, los linajes que constituyen la masa celular interna (*inner cell mass*, ICM) o el trofoectodermo muestran también una asimetría epigenética; en la masa celular interna aumenta la metilación del ADN y de las histonas (figura 5).<sup>6</sup>

Hace poco se reportó que en el estadio de cuatro células, los niveles de metilación de ciertos aminoácidos en las histonas están más elevados en las células que contribuyen a la masa celular interna, eso indica que la información epigenética influye en el destino de la determinación celular.<sup>7</sup>

Otro evento de fertilización es la señalización intracelular provocada por la entrada del espermatozoide y que resulta en ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorio. Asimismo, suceden cambios en la poliadenilación de ARNm materno, es decir, de transcritos que se produjeron en el ovocito durante su formación. Finalmente, empieza

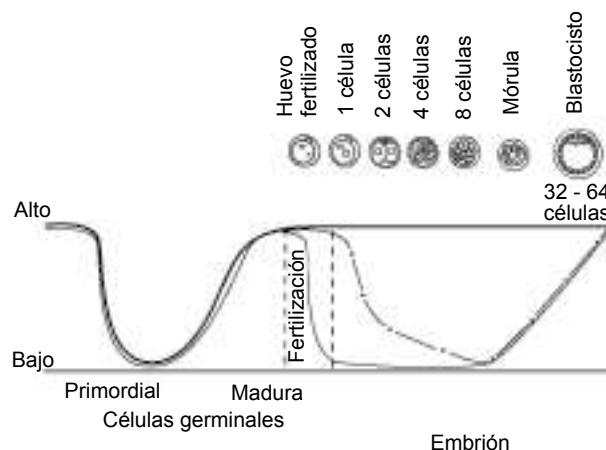


**Figura 5.** Reprogramación de la metilación durante el desarrollo embrionario del ratón. Esquema de los niveles relativos de metilación del ADN en las células germinales y en el desarrollo embrionario. La impronta de los genes metilados y la secuencia genética sin impronta. En las células germinales primordiales, altamente metiladas, entran en la cordillera germinal y empieza la diferenciación y expansión. Las células germinales primordiales sufren a lo largo del genoma una demetilación. Así, la fase de reprogramación incluye borrado y reseteo de las marcas específicas de origen parental (impronta) que incluye la metilación del ADN. La segunda fase de reprogramación de la metilación ocurre entre la fertilización y la formación del blastocisto. En la fertilización se observa asimetría entre el material genético parental, con la pérdida de la metilación de manera preferencial en el genoma paterno. Este proceso se efectúa en ausencia de transcripción y replicación de ADN, es decir, en el espacio de unas horas, por lo que se deduce que se trata de una demetilación activa. La iniciación de la metilación del ADN de *ново* ocurre después del quinto ciclo celular y coincide con la formación del blastocisto. Figura modificada de Santos F, 2004.

la síntesis de proteínas propias del embrión, que no son maternas.

Los cambios que acompañan a la fertilización no han podido reproducirse del todo en la fertilización artificial o fecundación *in vitro*. Por ejemplo, la incorporación de la membrana del espermatozoide provoca, en la membrana del ovocito (oolema), la reacción de bloqueo rápido de poliespermia, mientras que en los ovocitos activados por inyección intracitoplásmica del espermatozoide (*intra-cytoplasmatic sperm injection*, ICSI), técnica frecuentemente usada en la fertilización *in vitro*, el ovocito recién fertilizado puede ser penetrado por otros espermatozoides durante varias horas, debido a que no se desarrolla la reacción de bloqueo del oolema.<sup>8</sup>

## PRINCIPALES EVENTOS DURANTE EL DESARROLLO DEL EMBRIÓN ANTES DE LA IMPLANTACIÓN

Los procesos desencadenados por la fertilización incluyen la transición-materno-cigótica, misma que lleva consigo la degradación de transcritos maternos y la activación del genoma del cigoto que, al mismo tiempo, implica la reprogramación de la expresión de genes indispensables para el desarrollo embrionario subsiguiente. Aunque la principal actividad transcripcional de la expresión de genes ocurre durante el estadio de dos células, la transcripción es evidente en el embrión-l-célula.

### Funciones biológicas de la transición de la madre al cigoto

El control de la traducción juega un papel importante en la maduración del ovocito y es un proceso que también ocurre durante el desarrollo temprano del embrión. En este proceso participa la proteína MSY2 (familia de proteínas multifuncional caja-Y) implicada en la inhibición de la traducción de los ARNm maternos. MSY2 participa en la regulación de la estabilidad de los ARNm durante el crecimiento del ovocito y en la maduración del mismo se inactiva después de la fertilización.<sup>9</sup>

Cuando el genoma del embrión se activa, se inicia el control del proceso de maduración del ovocito, la terminación de la meiosis y algunos eventos de la posfertilización. Posteriormente, el cigoto empieza a

producir sus propios ARNm y las correspondientes proteínas; asimismo, los transcritos maternos se van degradando poco a poco. Esta transición se conoce como la transición desde la madre al cigoto (*maternal-to-zygotic transition*, MZT). Esto implica que el desarrollo es inicialmente sustentado por las proteínas heredadas de la madre presentes en el ovocito, y que los transcritos maternos son reemplazados por los transcritos del cigoto. En el desarrollo de organismos multicelulares existe un periodo de silencio transcripcional, que va desde que el ovocito alcanza el crecimiento completo (*fully growth oocyte*) hasta que la activación del genoma embrionario se reanuda varias horas después de la fertilización.

La transición materna al cigoto tiene varias funciones que son requeridas durante la preimplantación del embrión y que se resumen en tres funciones:

1) Destrucción de los transcritos maternos del ovocito (ARNm unidos a MSY2) y degradación de los depósitos de ARNm maternos. Al parecer, la degradación de los ARNm maternos es un mecanismo que dirige el inicio del desarrollo del ovocito al embrión.

2) Reemplazo de los transcritos maternos localizados en el ovocito, por nuevos transcritos de origen cigótico. Si éstos no se reemplazan por los transcritos del cigoto, el desarrollo se altera por la incapacidad del embrión de ejecutar las funciones celulares básicas. La producción de nuevos transcritos implica la activación del genoma embrionario (*embryonic genome activation*, EGA) o activación génica del cigoto (*zygotic genome activation*).<sup>10</sup>

3) Promoción de la reprogramación del patrón de expresión de los genes en el cigoto, acompañada de la generación de nuevos transcritos que no se expresaron en el ovocito.<sup>11</sup>

Es probable que la transición sea consecuencia de la reprogramación, y no viceversa. Las modificaciones covalentes de las histonas y la metilación del ADN son las marcas epigenéticas más importantes en el desarrollo del embrión preimplantado. Después de la fertilización los gametos sufren una fuerte reprogramación que incluye cambios en la metilación del ADN, modificación en las histonas e incorporación diferencial de histonas especializadas. Los cambios

epigenéticos del genoma parental pueden ser necesarios para activar la transcripción cigótica.<sup>12</sup>

En experimentos de transferencia nuclear se demostró la pérdida de la capacidad funcional del citoplasma de un ovocito para reprogramar un núcleo somático, esto sugiere la importancia de la asimetría epigenética entre los dos genomas parentales y las funciones de la transición cigótica para el desarrollo embrionario correcto.

#### *Reprogramación epigenética en el desarrollo embrionario*

Las modificaciones covalentes de las histonas y la metilación del ADN son las marcas epigenéticas más importantes en el desarrollo del embrión preimplantado. Recientemente se publicó que los mecanismos epigenéticos en el embrión temprano no sólo implican cambios en la modificación de las histonas, sino también incluye el reemplazo de las histonas y algunas variantes de éstas, en particular la H3.3.<sup>7</sup> A pesar de que el contenido genético es el mismo en ambos gametos (núcleo haploide, 23 cromosomas), las diferencias en la información epigenética refuerzan su naturaleza distintiva. El marcado epigenético confiere estabilidad a la expresión de genes y a la estructura de la cromatina, con esto se logra que la información se traduzca adecuadamente durante el desarrollo del organismo que inicia desde el embrión-1-célula. Las “marcas” o información epigenética contribuyen al desarrollo y dicha información puede regular el destino celular.

Después de la fertilización ambos pronúcleos migran al centro del cigoto, pero permanecen separados durante las fases S y G2 del ciclo celular. Los dos pronúcleos se “sincronizan” para que se lleve a cabo la metafase de la primera mitosis. La primera división mitótica se completa con la telofase y citocinesis del cigoto. La duración de la mitosis del cigoto del ratón es aproximadamente de 119 minutos.

Aun sin la fusión del material nuclear de los gametos, en el cigoto se inicia un proceso finamente controlado.

#### **Génesis de la polaridad**

La génesis de la polaridad, es decir la regionalización en los embriones tempranos de los mamíferos, es otro aspecto importante para el desarrollo de todo el organismo. En teoría, la polaridad es el resultado de la

distribución de los ARNm y proteínas en el embrión. Esta distribución asimétrica es importante ya que si estas moléculas no se distribuyen correctamente, entonces el patrón del embrión se afecta. Esta distribución asimétrica de componentes moleculares es muy obvia en el ovocito de embriones de otras especies no mamíferas, como en *Xenopus* (rana), el pez y los erizos de mar. Sin embargo, en los embriones de mamíferos dichos componentes maternos teóricamente distribuidos asimétricamente no se ha identificado con claridad.

En el embrión de ratón la polarización de los blastómeros, entre las divisiones del estadio de 8 a 16 células, que se refleja en la generación de divisiones asimétricas y simétricas, es necesaria para la formación de dos diferentes tipos de células en el blastocisto: la masa celular interna y el trofoectodermo. Consecuentemente ocurre la formación del blastocisto y su eje embrionario-abembrionario: la región del embrión que incluye la masa celular interna demarca la parte embrionaria, mientras que la cavidad es la parte abembrionaria.

En la mayor parte de las especies la polaridad del embrión se establece desde la maduración del ovocito o durante la fertilización, como consecuencia de la localización asimétrica de determinantes celulares. Algunos autores piensan que en los mamíferos la polaridad se desarrolla técnicamente después de la implantación. Antes se pensaba que los blastómeros (células del embrión temprano) son células idénticas hasta que ocurre la generación de células diferentes resultantes de divisiones asimétricas. En la actualidad hay varias demostraciones que sugieren que el establecimiento de los ejes del embrión puede realizarse en el cigoto, y que los ejes embrionario-abembrionario, antero-posterior (craneal-caudal), pueden encontrarse, por ende, delimitados en el embrión preimplantado. El desarrollo del embrión de mamífero es altamente regulativo, esto significa que aunque pueda haber una tendencia en el seguimiento de ciertas pistas del patrón, que se dan a lo largo del desarrollo de la preimplantación normal, el destino celular no está fijado en ningún momento y si el embrión es perturbado, el patrón puede volver a establecerse. Por esto, la adopción o el seguimiento de un patrón en el embrión de ratón no son estrictamente necesarios para su desarrollo.

Después de la fertilización, luego de los procesos mencionados, el cigoto sufre un cambio pronunciado en el metabolismo y comienzan las divisiones celulares. Durante este tiempo (tres días en el caso del ratón) el embrión aún está encasquetado en la zona pelúcida y es transportado a través del oviducto uterino hacia el útero para su implantación.

### Primera división mitótica del cigoto

Al parecer, el cigoto es simétrico; sin embargo, es el producto del ovocito previo a la división meiótica II. Cuando se expulsa el segundo cuerpo polar, la asimetría del cigoto se vuelve evidente por la posición del cuerpo polar. El cuerpo polar es una de las notas características que, convencionalmente, define el polo "animal". Otra característica de la asimetría es el cono de fertilización, que es una estructura temporal (su existencia dura aproximadamente 30 minutos) que se forma cerca del punto de entrada del espermatozoide en el ovocito.<sup>13</sup>

En la actualidad, el estudio de las primeras divisiones del cigoto ha tenido un atractivo especial, porque sigue abierta la interrogante sobre si las primeras divisiones son, en cierto sentido, aleatorias o si existen algunos patrones "flexibles" que conducen al desarrollo embrionario que permite cierta plasticidad.

Diversos investigadores (Gardner RL, Zernicka-Goetz M, Fujimori T) han estudiado el patrón de las primeras divisiones en el embrión de ratón. En ausencia de un marcador confiable, inherente al mismo cigoto, las observaciones experimentales se llevan a cabo siguiendo el comportamiento de factores externos o de "señales", como el punto de entrada del espermatozoide o el cuerpo polar (que refleja el sitio de la segunda división meiótica).<sup>14-17</sup>

Algunas observaciones muestran una correlación entre la polaridad del cigoto y el blastocisto, ya que la simetría del plano bilateral del blastocisto temprano se encuentra, por lo general, ortogonal al eje animal-vegetal del cigoto. Así, el eje embrionario-abembrionario (em-ab) tiende a formar un ángulo recto al plano de la primera división. Estas correlaciones no ocurren en todos los embriones analizados, pues no todos los embriones se han reexaminado (sólo 60% del total) debido a dificultades técnicas.<sup>18</sup>

Puesto que el eje embrionario-abembrionario puede estar relacionado con el plano de la primera división mitótica, es importante tratar de entender cómo se genera esta primera división. La primera división mitótica ocurre, generalmente, en el plano meridional (86% de los cigotos analizados), a lo largo del eje A-V, tomando como marcador del polo animal del cigoto al segundo cuerpo polar. Así, si el cuerpo polar se trasplanta experimentalmente a otra región del cigoto, se puede inducir el sitio de la primera división mitótica, que ocurre a través de la 'nueva' posición del cuerpo polar (76% de los cigotos experimentales). El punto de entrada del espermatozoide (*sperm entry position*, SEP) se relaciona, en cierta medida, con el plano de la primera división y puede, por consecuencia, definir la parte embrionaria y abembrionaria del futuro blastocisto. Esto se debe a la alineación del espermatozoide con el plano de la primera división mitótica (67% de los embriones analizados).

Estos factores (PB y el SEP) en la superficie del huevo proveen de manera general, aunque no absoluta, un marcador de la primera división. Richard Gardner reporta que cuando el cuerpo polar logra permanecer adherido a lo largo del desarrollo temprano hasta el estadio de blastocisto, no solamente marca la primera división, sino que también marca el límite entre la parte embrionaria-abembrionaria del blastocisto. Esto lo confirmó posteriormente el grupo de Zernicka-Goetz, quienes mostraron que el punto de entrada del espermatozoide provee un marcador en la superficie del ovocito para el plano de la primera división. Cuando el espermatozoide se marcó con Alexa flúor 448, esperando no perturbar el desarrollo del embrión, en la mayor parte de los huevos fertilizados (88%), encontraron la marca fluorescente en la región central, cerca del surco de la primera división. Posteriormente, el mismo laboratorio demostró que la citocinesis pasa cercana al sitio previo de la meiosis, así como el SEP y la trayectoria del pronúcleo masculino, en una mayoría significativa de los huevos fertilizados.<sup>15-19</sup>

Sin embargo, todos estos reportes aún son motivo de controversia. Otro grupo sugiere que la primera división se establece cuando los dos pronúcleos se posicionan en el centro del cigoto, justo antes de entrar en la fase M y no en una fase tardía de la interfase.<sup>20,21</sup> Esos autores mencionaron después que la

primera escisión ocurre a una distancia considerable del eje A-V, y que el segundo cuerpo polar se mueve más tarde muy cerca del surco de la escisión. Este grupo afirma que el plano de la primera división determina la localización final del segundo cuerpo polar y no viceversa. Sin embargo, faltan elementos para conocer con exactitud estos mecanismos, particularmente a causa de que los parámetros de los análisis realizados por los dos grupos son diferentes. Por ejemplo, mientras Plusa y colaboradores toman en cuenta la estructura y la posición tridimensional que los pronúcleos adoptan durante su migración, Hiiragi y colaboradores, no lo hacen así. Así pues, los mecanismos moleculares y la descripción exacta que dirigen la primera división todavía no se conocen del todo.<sup>16,21-23</sup>

#### **Otros eventos que regulan la activación de las primeras divisiones: concentración de iones de calcio libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$**

La primera división se caracteriza por una fase G1 larga, que se inicia con la elevación del  $Ca^{2+}$  causada por la entrada del espermatozoide. En los ovocitos de las especies animales estudiados hasta la fecha, la fertilización por espermatozoide evoca una elevación en la concentración de iones de calcio libre intracelular  $[Ca^{2+}]_i$ . Estas oscilaciones de calcio son importantes para la regulación del metabolismo del cigoto. En los ovocitos de los mamíferos superiores, el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  se da en forma de oscilaciones largas, iniciadas inmediatamente después de la fecundación por el espermatozoide y terminando alrededor de la primera mitosis del ciclo celular. Estas oscilaciones son necesarias y suficientes para completar los eventos de activación del ovocito que, en términos generales, comprende la reacción de bloqueo a poliesperma, así como el reinicio y terminación de la meiosis.<sup>16,17</sup>

La  $[Ca^{2+}]_i$  participa en la separación de los cromosomas durante la transición metafase-anafase de las células hijas o citocinesis, y en la mitosis, particularmente en la rotura de la envoltura nuclear y la condensación de los cromosomas.<sup>24</sup> Aunque los mecanismos por los que el espermatozoide inicia estas concentraciones transitorias de  $Ca^{2+}_i$  no están plenamente comprendidos, hay pruebas que sugieren que el espermatozoide contiene un factor que activa

la vía fosfoinositol, que es regulada por calcio y que desencadena dichos procesos celulares. En el ratón se demostró que el reclutamiento de los ARNm maternos se inicia y es diferencialmente regulado por oscilaciones de las  $[Ca^{2+}]_i$ , es decir, la transición ovocito-embrión está implicada por la respuesta diferencial a las ondas de los iones de calcio, y la activación del cigoto después de la fertilización también se inicia y es regulada por la duración de la señal sostenida por la  $[Ca^{2+}]_i$ .<sup>25,26</sup>

Cuando concluye la primera división se forman dos células o blastómeros similares en apariencia y aproximadamente del mismo tamaño. Ambos blastómeros resultantes pueden contribuir al desarrollo de la masa celular interna (ICM) y del trofoectodermo.<sup>27</sup>

La orientación de las divisiones de la segunda escisión es variable, puede ser meridional (M) es decir, paralela al eje animal-vegetal, E ecuatorial (E perpendicular a M, es decir, al eje animal-vegetal). Mientras en el primer tipo de división las dos células resultantes heredan componentes del polo animal y del polo vegetal, en las divisiones ecuatoriales dichos polos son segregados y una de las células resultantes será "animal" y la otra "vegetal". La división de los blastómeros del estadio de dos células es asincrónica, es decir, un blastómero se divide antes que el otro. En la mayoría de los casos, cuando el plano de la división del primer blastómero que se divide es meridional y el del segundo ecuatorial (embriones ME), el primero contribuye, predominantemente, a la parte embrionaria y el otro a la parte abembrionaria del blastocisto. Cuando el plano de división del primer blastómero se divide es ecuatorial y el del segundo meridional (embriones EM), el primer blastómero puede dar lugar a la parte embrionaria o abembrionaria con igual probabilidad. Este patrón de división describe dos tipos de embriones claramente diferentes (ME e EM). En efecto, estos resultados no se esperarían si el patrón de desarrollo del blastocisto fuera totalmente aleatorio.<sup>28,29</sup> Estas evidencias contribuyen a pensar que cada blastómero del embrión, del estadio de dos células, cuando menos en un subgrupo de embriones, tienen propiedades diferentes de desarrollo y, por lo tanto, un destino celular diferente.

La localización asimétrica de ARNm que codifica para el factor de transcripción (Cdx2) que se expresa

en el trofoectodermo, es requerido para la diferenciación correcta de dicho tejido. Se ha observado que la pérdida de este factor de transcripción provoca fallas en la regulación de Oct-4 y Nanog (factores de transcripción) en las células externas del blastocisto y subsecuentemente la muerte de esas células. Cdx2 es esencial para la segregación de los linajes de la ICM y del trofoectodermo en la fase de blastocisto.<sup>30</sup> Recientemente se reportó que los niveles de proteína de Cdx2 son altamente variables en los blastómeros.<sup>31</sup> Bajo estas condiciones experimentales la distribución asimétrica de la proteína de Cdx2 en los blastómeros definiría el linaje del trofoectodermo.

Los mecanismos tempranos que dirigen el desarrollo del cigoto, así como el crecimiento y el desarrollo embrionario subsiguiente, son procesos finamente regulados y marcadamente flexibles, influidos enormemente por las interacciones moleculares y celulares, y controlados por algunos componentes bioquímicos (por ejemplo el  $[Ca^{2+}]_i$ ). Durante el desarrollo subsiguiente, la morfología celular, la adhesión diferencial, la migración celular, la gastrulación, colaboran para producir el plano corporal e iniciar la formación definitiva de los ejes corporales.

#### **Formación del blastocisto con sus distintos ejes**

En el estadio de ocho células ocurre una redistribución de proteínas localizadas en la membrana celular, así como de componentes del citoesqueleto. En este estadio, los blastómeros comienzan el proceso de compactación. Como consecuencia de la localización diferencial de componentes y de las divisiones simétricas y asimétricas que ocurren al estadio de ocho células, los blastómeros resultantes al estadio de 16 células heredan diferentes concentraciones de ciertos componentes de membrana. En este estadio pueden distinguirse por primera vez dos grupos de células en el embrión: las células internas y las células externas (que rodean a las células internas).

Los eventos que definen las características morfológicas que distinguen la parte embrionaria de la parte abembrionaria en el blastocisto se llevan a cabo al final de la quinta división después de la fertilización, es decir, en el estadio de 32 células. En esta fase, las células de la parte externa del embrión se han diferenciado en células epiteliales del trofoec-

todermo e inician un transporte activo de canales de  $Na^+/K^+$  que resulta en la acumulación de los fluidos internos y la formación de la cavidad del blastocisto.<sup>32</sup> La parte que alberga la cavidad (o blastocele) y el trofoectodermo mural es la parte abembrionaria. Por el contrario, la parte que alberga la masa celular interna y el trofoectodermo que la envuelve (trofoectodermo polar) define la parte embrionaria del blastocisto. Asimismo, el blastocisto no es perfectamente radial y compone un eje 'short-long', que es ortogonal al eje embrionario-abembrionario. Más tarde (aproximadamente 4.5 días después de la fertilización), la masa celular interna da lugar a la formación de otro tejido, el endodermo primitivo, que se desarrollará en el endodermo visceral y parietal durante la implantación. Como resultado de la implantación, el blastocisto sufre cambios morfogenéticos notables. El endodermo visceral (VE) envuelve tanto al epiblasto (Epi), que deriva de la masa celular interna y que dará lugar al embrión propiamente dicho, como al ectodermo extraembrionario (ExE), que deriva del trofoectodermo polar. Ambos tejidos extraembrionarios, del endodermo visceral y el ectodermo extraembrionario, proveen señales e interactúan genéticamente con el epiblasto para el establecimiento de los ejes corporales y la adquisición del patrón de los tejidos embrionarios. En este estadio, un día después de la implantación (5.5 días posfertilización), se distingue el eje proximal-distal del embrión: por convención, la parte más proximal es la que estará en contacto con la vasculatura materna, hacia donde se localiza el ectodermo extraembrionario, y la parte distal comprende al epiblasto.

Las primeras muestras palpables del eje anterior-posterior ocurren técnicamente después de la implantación. Al quinto día del desarrollo, un día después de que el blastocisto se implanta, un grupo de células localizadas en la parte distal del embrión y que expresan genes específicos, migran en dirección proximal. Este grupo de células se considera un *signalling centre* esencial para el futuro desarrollo del patrón embrionario y recibe el nombre de AVE (*anterior visceral endoderma*). La expresión de genes en el AVE define una asimetría molecular en el embrión. La posición final que estas células adoptan es lo que establece el polo anterior. Por consiguiente, el polo

opuesto será el polo posterior. De esta manera queda establecido el eje anterior-posterior un día después de la implantación y unas cuantas horas antes de que la gastrulación comience. Ésta se inicia con la formación de la línea primitiva (*primitive streak*) en el polo posterior del embrión. Un reto importante es tratar de entender cuál es el origen de las células del AVE y si estas células tienen un origen fijo directamente en células preexistentes en el blastocisto preimplantado. Si bien hay una cierta correlación entre la posición que las células del endodermo primitivo (o sus precursores) tienen en el blastocisto y la posición (más proximal o más distal) que estas células o sus hijas adoptan después de la implantación, no hay aún pruebas definitivas de la relación exacta entre el AVE y posibles progenitores en el blastocisto. Asimismo, algunos de los genes que se expresan específicamente en el AVE, ya se expresan en el estadio de blastocisto. Sin embargo, el destino celular particular de las células que expresan dichos genes y si realmente contribuyen a la formación del AVE después de la implantación no está establecido.<sup>33,34</sup>

En conclusión, el eje anterior-posterior queda establecido después de la implantación, antes de la gastrulación. Aunque hay algunas pistas sobre una posible influencia de la preimplantación sobre el establecimiento del eje anterior-posterior, dicha relación no se ha definido. Por el contrario, pero sin excluir lo anterior, es claro que el conjunto de interacciones celulares que derivan progresivamente de los diferentes tejidos del embrión juega un papel decisivo en el establecimiento del patrón corporal.

## GLOSARIO

**Alantoides.** Extensión tubular de la capa interna (endodermo) del saco vitelino. En los embriones de los mamíferos los vasos alantoides se convertirán en los vasos umbilicales.

**Blastómero.** Nombre que reciben las células del embrión temprano.

**Ciclo celular.** La división del ciclo celular ocurre en cuatro fases bien definidas y la fase G0, que se refiere a la diferenciación celular. Fases G: intervalos entre las divisiones celulares o mitosis. Fase G0: células

terminalmente diferenciadas que pueden permanecer fuera del ciclo celular, casi de manera indefinida, o bien hasta nuevo estímulo. Fase G1: punto de re-entrada al ciclo celular, durante ésta se realiza la síntesis de ARN y de proteínas, pero no la de ADN. Fase S: fase de síntesis del ADN en la célula, resulta en la duplicación del ADN. Se sintetizan también algunos ARN y proteínas. Fase G2: no se sintetiza ADN, pero sí ARN y proteínas. Fase M: mitosis, durante esta etapa se rompe la envoltura nuclear, los cromosomas se aparean y se separan. La mitosis resulta en la repartición de los dos juegos idénticos de cromosomas en las células hijas resultantes.

**Cigoto.** Célula diploide que resulta de la fecundación de un óvulo por un espermatozoide. Contiene una copia del material genético paterno y una del materno. En condiciones experimentales, un ovocito también puede ser activado por partenogénesis; es decir, que el ovocito es *inducido* a comenzar las divisiones celulares, puede producirse antes de la replicación, es decir, que el partenote resultante contiene sólo una copia (haploide) de material genético, o después de la replicación, en donde el partenote resultante contiene información diploide, como en cualquier célula somática normal.

**Cono de fertilización.** Protuberancia rica en filamentos de actina que se forma transitoriamente en el huevo fertilizado, en el punto de entrada del espermatozoide.

**Cromatina.** Es el conjunto de ADN, de histonas y de proteínas-no-histonas que se encuentran en el núcleo de las células. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas.

**Cuerpo polar (*polar body*, PB).** Pequeña célula que es expulsada del ovocito durante la meiosis y contiene un juego de cromosomas. El primer cuerpo polar, por lo general, se degenera, mientras que el segundo permanece unido al embrión y sirve como marcador del polo animal.

**Eje animal-vegetal.** Eje que pasa a través del cuerpo polar. La región cercana al cuerpo polar determina el polo animal y la región opuesta (180 grados) al cuerpo polar es, por consecuencia, el polo animal.

**Embrión.** Resultado de la fertilización de un óvulo con un espermatozoide. En el humano se considera embrión desde la fecundación hasta el término de 8

semanas de gestación. Después de este tiempo se le llama feto.

**Factores de transcripción.** Proteínas que reconocen secuencias específicas del ADN que ayudan a reconocer el sitio del promotor para que inicie la transcripción. Estos factores se unen a los elementos cis reguladores. Por ejemplo, Spl es un transactivador de unión a ADN de un gran número de genes en los eucariotes superiores; TBP es una proteína de unión a la caja TATA. TATA *binding protein*. *ets-1* es un factor de transcripción descubierto como un protooncogén: virus aviar eritroblastosis v-ets, se ha reportado que está involucrado en mecanismos de diferenciación, activación y proliferación celular.

**Histonas.** Proteínas que se unen al ADN dando como resultado el empaquetamiento ordenado del ADN en nucleosomas. Proteínas presentes sólo en eucariotes.

**Impronta parental o imprinting.** Marca que se impone a las regiones del ADN en el cromosoma paterno o materno y que tiene efectos sobre la expresión o represión de genes específicos a partir del material genético paterno o materno. De esta manera, el *imprinting* determina la contribución diferencial de la dotación genética del padre y la madre para el desarrollo del embrión en genes determinados. El *imprinting* está regulado principalmente por marcas de metilación de ADN.

**Información epigenética.** Información que se impone al ADN "independientemente" de su secuencia primaria y que regula la expresión de genes a nivel transcripcional y postranscripcional. Por definición, la información epigenética es heredada al curso de divisiones celulares; es decir, esa información la contiene toda la progenie de una célula determinada. Los mecanismos epigenéticos incluyen, principalmente, la metilación del ADN, modificaciones covalentes de las histonas, y remodelación de la cromatina. La reprogramación epigenética es la modificación del programa de la expresión del genoma regulado por dichos mecanismos epigenéticos y como consecuencia es borrada o "reseteada" la información de dicho genoma para dar lugar a una nueva programación, sin modificar la secuencia del ADN.

**Maduración del ovocito.** Proceso que se da bajo la estimulación hormonal adecuada y que reanuda el

arresto de la profase I de la meiosis. Como resultado, se reduce el número de cromátides al ser expulsadas dentro del primer cuerpo polar.

**Masa celular interna.** Células internas del blastocisto, pluripotenciales, que dan lugar a todos los tipos celulares del embrión.

**Meiosis.** Es la división celular de una célula diploide que tiene como resultado la reducción del número de cromosomas y da lugar a cuatro células haploides. Involucra dos divisiones con sus respectivas fases: *profase*, *metafase*, *anafase*, *telofase*. En la primera división, en una prolongada *profase*, se da el apareamiento de los cromosomas homólogos y el entrecruzamiento de segmentos entre los cromosomas o recombinación. *Metafase*, cromosomas paternos y maternos alineados. *Anafase*, el surco de la separación de los cromosomas se forma con ayuda de los microtúbulos. *Telofase*, cada uno de los cromosomas se secretan hacia diferentes células.

**Metilación de novo.** Es la adición de grupos metilo a la citocina del ADN. La adición de estos grupos suele provocar un cambio en el patrón de expresión de genes en donde ocurre dicha metilación. En la mayoría de los casos, de la metilación de un gen, resulta un gen silenciado ó inactivo. Esto quiere decir que, salvo algunas excepciones, genes no metilados son genes que se expresan, generando una información epigenética en este gen, que es característica para esa célula en particular que lo porta.

**Pronúcleo.** Núcleo haploide (femenino o masculino) del cigoto.

**Protaminas.** Proteínas implicadas en el empaquetamiento del ADN de los espermatozoides maduros.

**Trofoectodermo.** Linaje celular que envuelve la masa celular interna en el blastocisto y que principalmente origina los anexos embrionarios (por ejemplo, la placenta), y no al embrión propiamente dicho.

**Zona pelúcida.** Membrana que recubre al ovocito, de aproximadamente 13 micras de grueso. Contiene un gran número de copias de las proteínas ZP3, ZP1 Y ZP2 glucosiladas.

## REFERENCIAS

1. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-93.

2. Santos F, Peters AH, Otte AP, Reik W, Dean W. Dynamic chromatin modifications characterize the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol* 2005;280:225-36.
3. Morgan H, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14:R47-R58.
4. Eckardt S, McLaughlin KJ. Interpretation of reprogramming to predict the success of somatic cell cloning. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:97-108.
5. McLaren A, Lawson KA. How is the mouse germ-cell lineage established? *Differentiation* 2005;73:435-7.
6. Nonchev S, Tsanev R. Protamine-histone replacement and DNA replication in the male mouse pronucleus. *Mol Reprod Dev* 1990;25:72-76.
7. Reik W, Santos F, Mitsuya K, Morgan H, Dean W. Epigenetic asymmetry in the mammalian zygote and early embryo: relationship to lineage commitment? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:1403-9.
8. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 2004;127:643-51.
9. Torres-Padilla ME, Parfitt DE, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 2007;445:214-8.
10. Maleszewski M, Kimura Y, Yanagimachi R. Sperm membrane incorporation into oolema contributes to the oolemma block to sperm penetration: evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. *Mol Reprod Dev* 1996;44:256-9.
11. Yu J, Hecht NB, Schultz RM. Expression of MSY2 in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2001;65:1260-70.
12. Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays* 1993;15:531-8.
13. Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one and two cell stages. *Development* 1991;112:921-32.
14. Gardner RL. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with animal-vegetal axis of the zygote of the mouse. *Development* 1997;124:289-301.
15. Zernicka-Goetz M. Cleavage pattern and emerging asymmetry of the mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:919-28.
16. Hiiragi T, Solter D. First cleavage plane of the mouse egg is not predetermined but defined by the topology of the two apposing pronuclei. *Nature* 2004;430:360-4.
17. Hiiragi T, Solter D. Mechanism of first cleavage specification in the mouse egg: is our body plan set at day 0? *Cell Cycle* 2005;4:661-4.
18. Torres-Padilla ME, Bannister AJ, Hurd PJ, Kouzarides T, Zernicka-Goetz M. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *Int J Dev Biol* 2006;50:455-61.
19. Gray D, Plusa B, Piotrowska K, Na J, et al. First cleavage of the mouse embryo responds to change in egg shape at fertilization. *Curr Biol* 2004;14:397-405.
20. Plusa B, Piotrowska K, Zernicka-Goetz M. Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. *Genesis* 2002;32:193-8.
21. Piotrowska K, Zernicka-Goetz M. Role of sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature* 2001;409:517-21.
22. Plusa B, Hadjantonakis AK, Gray D, Piotrowska-Nitsche, et al. The first cleavage of the mouse zygote predicts the blastocyst axis. *Nature* 2005;434:391-5.
23. Motosugi N, Bauer T, Polanski Z, Solter D, Hiiragi T. Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned. *Genes Dev* 2005;19:1081-92.
24. Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol* 1995;30:21-62.
25. Tang TS, Dong JB, Huang X, Sun FZ. Ca(2+) oscillations induced by a cytosolic sperm protein factor are mediated by a maternal machinery the functions only once in mammalian eggs. *Development* 2000;127:1141-50.
27. Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Zhe, et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. *Dev Biol* 2002;250:280-91.
28. Ozil JP, Markoulaki S, Toth S, Matson S, et al. Egg activation events are regulated by duration of a sustained [Ca2+]cyt signal in the mouse. *Dev Biol* 2005;282:39-54.
29. Fujimori T, Kurotaki Y, Miyazaki J, Nabeshima Y. Analysis of cell lineage in two and four cell mouse embryos. *Development* 2003;130:5113-22.
30. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005;132:2093-102.
31. Dietrich JE, Hiiragi T. Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development* 2007;134:4219-31.
32. Watson AJ, Bacroft LC. Regulation of blastocyst formation. *Front Biosci* 2001;6:708-30.
33. Weber RJ, Pedersen RA, Wianny F, Evans MJ, Zernicka-Goetz M. Polarity of the mouse embryo is anticipated before implantation. *Development* 1999;126:5591-8.
34. Takaoka K, Yamamoto M, Shiratori H, Meno C. The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation. *Dev Cell* 2006;10:451-9.

Estimado editor, en el volumen 75, número 10, de *Ginecología y Obstetricia de México* está publicado el artículo "Biopsia del cuello uterino ¿es confiable y reproducible el diagnóstico histológico? Utilidad de p16INK4A para lograrlo", del cual soy autor. Quizá por razón de envío por medio electrónico de la revisión corregida no fueron incluidos en la publicación dos cuadros de suma importancia, ya que sin ellos los resultados y la discusión quedan confusos en algunos puntos y el lector podría considerar que no están analizados adecuadamente. Anexo a continuación los cuadros y su correcta situación en el texto.

Atentamente  
Dr. José Curiel Valdés  
Grupo Diagnóstico

En la página 617, columna 2, primer párrafo del apartado "resultados", debe decir:

**Cuadro 1.** Diagnósticos del fragmento número 1

| Diagnóstico              | Hematoxilina-eosina, núm. | %     | p16, núm. | %   |
|--------------------------|---------------------------|-------|-----------|-----|
| Reactivo/inflamatorio    | 14                        | 23.0  | 0         | 0   |
| Sugestivo de VPH         | 5                         | 8.2   | 0         | 0   |
| Displasia leve NIC 1     | 32                        | 52.5  | 61        | 100 |
| Displasia moderada NIC 2 | 9                         | 14.8  | 0         | 0   |
| Displasia grave NIC 3    | 1                         | 1.6   | 0         | 0   |
| Carcinoma                | 0                         | 0.0   | 0         | 0   |
| Total                    | 61                        | 100.0 | 61        | 100 |

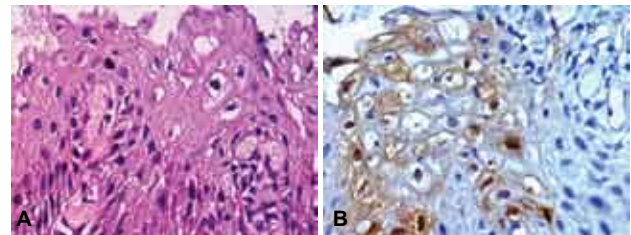


**Figura 1.** Imagen del fragmento 1a teñido con hematoxilina y eosina. Se aprecian células con coilocitosis en fase poco productiva, con criterios sugerentes de NIC 1, desarreglo de la capa basal, hiperchromatismo y crecimiento nuclear hacia la superficie con halo claro perinuclear. Sólo 52.5% de los patólogos hizo el diagnóstico correcto.

Fragmento 1b con p16. Es clara la positividad de p16 nuclear y citoplásmica de leve a intensa (+ a +++), en la parte central células con coilocitosis poco productiva y en la periferia, a ambos lados, células sin positividad. Las células negativas tienen núcleos más chicos y carecen de halo perinuclear. Esta positividad corresponde a VPH de alto riesgo. Con p16 todos los patólogos realizaron el diagnóstico correcto. (Reproducida con permiso de Masson Doyma México).

**Cuadro 2.** Diagnósticos del fragmento número 2

| Diagnóstico              | Hematoxilina-eosina, núm. | %     | p16, núm. | %     |
|--------------------------|---------------------------|-------|-----------|-------|
| Reactivo/inflamatorio    | 12                        | 19.7  | 0         | 0     |
| Sugestivo de VPH         | 3                         | 4.9   | 0         | 0     |
| Displasia leve NIC 1     | 32                        | 52.5  | 0         | 0.0   |
| Displasia moderada NIC 2 | 10                        | 16.4  | 59        | 96.7  |
| Displasia grave NIC 3    | 2                         | 3.3   | 0         | 0.0   |
| Carcinoma                | 2                         | 3.3   | 2         | 3.3   |
| Total                    | 61                        | 100.0 | 61        | 100.0 |

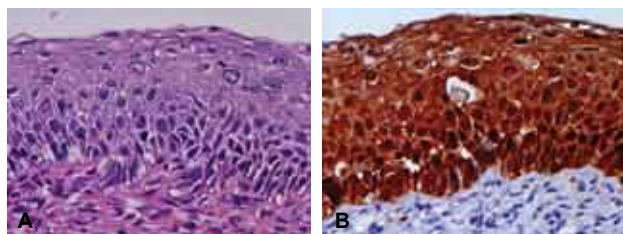


**Figura 2.** Imagen del fragmento 2a teñido con hematoxilina y eosina. Se aprecian células con displasia moderada, sugieren NIC 2, hay mayor densidad celular, los núcleos son muy hiper-cromáticos, con pleomorfismo y citoplasma muy chico; las atipias se conservan hasta la superficie en muchas células y adquieren más citoplasma en la superficie, lo que indica cierto grado de maduración que las hace diferentes al NIC 3. Sólo 16.4% realizó el diagnóstico correcto.

En el fragmento 2b, el p16 es positivo difuso, y en todo el espesor es nuclear y citoplásmico. Esta positividad confirma el VPH de alto riesgo y NIC 2. El 100% de los patólogos hizo el diagnóstico correcto con p16. (Reproducida con permiso de Masson Doyma México).

Los diagnósticos de cada uno de los fragmentos de la laminilla teñida con hematoxilina y eosina (figura 1a) se encuentran en el cuadro 1. Su dispersión en el frag-

mento 1 abarcó desde cambios inflamatorios, metaplasia o ambos, sin neoplasia intraepitelial del cuello uterino (23%); en 8.2% se encontraron cambios sugerentes pero no concluyentes de virus del papiloma humano, en 52.5% displasia leve (NIC 1), en 14.8% displasia moderada (NIC 2) y en 1.6% displasia grave (NIC 3). No hubo diagnósticos de carcinoma.

En el fragmento 2 (cuadro 2, figura 2a) 19.7% de los patólogos diagnosticó cambios inflamatorios reactivos, metaplasia o ambos; 4.9%, cambios sugerentes pero no concluyentes de VPH; 52.5%, displasia leve (NIC 1); 16.4%, displasia moderada (NIC 2); 3.3%, displasia grave (NIC 3), y 3.3%, carcinoma. Con p16 el 100% interpretó el fragmento 1 (figura 1b) como positivo focal débil, en capas superficiales, nuclear y citoplásmico +a+++ (equivalente a NIC 1). Con p16 también el 100% interpretó al fragmento 2 (figura 2b) como positivo difuso, en todo el espesor, nuclear y citoplásmico +++ (equivalente a NIC 2); sin embargo, los dos patólogos que diagnosticaron carcinoma sostuvieron su diagnóstico, lo que supone 96.7% de concordancia.

## *Peristaltismo de la trompa de Falopio\**

Por el Dr. Alfonso ÁLVAREZ BRAVO.

Profesor de 3er C. de Clínica Quirúrgica.

Escuela de Medicina, U. N. A. México.

Jefe del Servicio de Ginecología del Sanatorio Español de México.

El transporte del óvulo desde el ovario hasta la cavidad uterina, a través de la luz tubaria, es un fenómeno complejo en el que intervienen: 1) las corrientes capilares de la cavidad pelviperitoneal, 2) la acción de las vísceras vecinas a los genitales, 3) la acción ciliar del epitelio tubario, 4) la quimiotaxis sugerida por KEYE<sup>13</sup>, la cual, sin embargo, no ha sido demostrada, 5) la actividad del aparato muscular de los anexos descrito por ROUGET<sup>23</sup>, dispuesto a lo largo del mesosalpinx y de los repliegues peritoneales conocidos con el nombre de ligamentos útero-ovárico, tubo-ovárico e infundíbulo-pélvico, y 6) de la acción peristáltica de la capa muscular de la trompa. Estos diversos mecanismos, puestos en juego, relacionan al pabellón tubario con el ovario según han demostrado objetivamente WESTMAN<sup>32</sup> y HARTMAN<sup>12</sup> en la coneja y en la mona, y permiten la entrada del óvulo a la luz tubaria, a lo largo de la cual es transportado el huevo en unos 3 a 5 días, para la especie humana.

El presente trabajo va a concretarse al estudio de la contractilidad intrínseca de la trompa de Falopio, sin detenerse a considerar la naturaleza y mecanismo de los otros factores mencionados.

Fue probablemente SOBOTTA<sup>30</sup> quien primero sugirió la posibilidad de que el transporte del huevo por la

trompa se debiera a los movimientos peristálticos de su capa muscular. SECKINGER<sup>27</sup> y SECKINGER y CORNER<sup>28</sup> demostraron que las contracciones tubarias tenían distinto carácter e intensidad según la época del ciclo menstrual en que se observaba el fenómeno y que ello dependía de la actividad secretora del ovario. ANAPOLSKI<sup>1</sup> apreció también que la longitud de las fibras musculares tubarias cambia durante las distintas fases del ciclo menstrual. WESTMAN<sup>32,33</sup> observó directamente los movimientos peristálticos de la trompa de la coneja a través de una ventana abdominal cubierta con una placa transparente y más tarde comprobó el mismo fenómeno durante el período ovulatorio, en la mona *Macacus Rhesus*, empleando un peritoneoscopia. RUBIN y BENDICK<sup>24</sup>, PARKER<sup>21</sup> y muchos otros han descrito también movimientos peristálticos y antiperistálticos de la trompa de los animales. Sin embargo, en la mujer no ha sido posible observar estos movimientos en el curso de laparotomías ni por medio del laparoscopia. Así lo afirman SIEGLER<sup>29</sup>, RUDDOCK<sup>26</sup>, PINCSOHN<sup>22</sup> y BUNSTER<sup>4</sup>. Por nuestra parte, en el curso de numerosas laparotomías y durante un buen número de observaciones a través del peritoneoscopia y del douglasoscopia de DECKER, jamás hemos visto movimientos peristálticos en la trompa humana. DYROFF<sup>8</sup> ha querido explicar este hecho por la acción paralizante de la anestesia general o de la analgesia raquídea a que están sometidas las enfermas durante las intervenciones quirúrgicas, así como por la acción que las drogas anestésicas tienen sobre la función

\* Reproducido de Ginecología y Obstetricia de México 1953;VIII:161-166.

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

ovárica. RUBIN <sup>25</sup> insiste además en que las mujeres que se operan tienen lesiones patológicas del aparato genital. En contra de esta opinión debemos mencionar nuestra experiencia expresada en líneas anteriores, de que durante peritoneoscopías y douglascopías hechas con anestesia local, en las que el aparato telescópico se introduce al abdomen a nivel de un sitio distante de la región tubaria. Nunca hemos podido observar movimientos peristálticos de la trompa no obstante que en varias ocasiones los órganos genitales internos eran completamente normales. Quizá la razón esté, como supone RUBIN <sup>25</sup>, en que la peristalsis de la trompa humana es mucho más débil y lenta que la de los animales y es, por lo tanto, difícil de apreciar.

Por el contrario, la observación *in vitro* de la trompa humana aislada y sumergida en solución salina oxigenada ha demostrado claramente la existencia de contracciones longitudinales que se originan en el pabellón y progresan hacia el extremo uterino de la trompa con intervalos de cuatro a cinco minutos y de contracciones circulares o anulares, que permiten suponer que la trompa humana tiene un alto grado de actividad contráctil intrínseca espontánea. En la comprobación de este hecho concuerdan los trabajos de GUNN <sup>10</sup>, KOK <sup>14</sup>, DANIEL y colaboradores <sup>7</sup>, CELLA y GEORGESCU <sup>5</sup> y WISLOKI y GUTTMACHER <sup>36</sup>.

En resumen, como opina BUNSTER <sup>4</sup>, es indudable que la trompa humana tiene movimientos peristálticos, pero es también evidente que son mucho menos activos que en las hembras animales, siendo probable que en la especie humana sea la actividad ciliar del epitelio mucho más importante que la acción de la musculatura tubaria, en el transporte del huevo por el oviducto.

De mayor importancia clínica es el estudio del peristaltismo tubario durante la insuflación transuterina de gas.

Si se hace esta insuflación empleando un aparato que registre quimográficamente las variaciones de presión concomitantes al paso del gas se obtiene una curva típica en los casos normales, en la que se aprecia un ascenso progresivo interrumpido por una caída brusca de la presión de 10 a 20 mm. de mercurio, seguido de una curva en la que aparecen oscilaciones de presión que varían de 10 a 50 mm. de mercurio. Estas fluctuaciones de la presión fueron atribuidas por GUTHMANN <sup>11</sup> a la actividad de la musculatura

tubaria y posteriormente RUBIN y sus colaboradores comprobaron este acerto basándose en los siguientes hechos y experiencias:

1.- La curva de insuflación hecha en úteros y trompas muertos, extirpados quirúrgicamente no muestra oscilaciones de la presión.

2.- La insuflación de trompas humanas aisladas, mantenidas vivas por inmersión en solución de LOCKE oxigenada, proporciona curvas con fluctuaciones de presión considerables, sobre todo cuando la solución está a la temperatura de 37° a 37.5° C.

3.- Conectando un balón intrauterino al aparato de insuflación y manteniendo una presión semejante a la que se registró en una insuflación uterotubaria previa, en esa misma enferma, no se obtuvieron oscilaciones comparables. El registro quimográfico de la actividad del útero transmitida al balón intrauterino mostró muy pequeñas fluctuaciones, de carácter completamente distinto.

4.- La posibilidad de que las fluctuaciones de presión sean debidas a la elasticidad de la pared tubaria queda eliminada por el hecho de que tales fluctuaciones no aparecen al insuflar directamente trompas recientemente extirpadas.

5.- La acción de otros factores extragenitales, sobre todo las que podían provenir de variaciones en la presión intraabdominal, no es admisible puesto que los cambios de presión originados por la tos, la respiración profunda y la acción de pujar modifican las curvas sólo en su altura general cuando las trompas son permeables, y no determinan alteración ninguna cuando están obstruidas.

6.- El efecto de la inyección intraperitoneal directa de gas no puede ser causa de las fluctuaciones puesto que las curvas registradas durante la inyección intraabdominal de gas, directamente por punción de la pared abdominal, son totalmente distintas a las obtenidas durante la insuflación úterotubaria.

7.- El efecto de las variaciones en la velocidad de paso del gas no es tampoco la causa de estas oscilaciones puesto que a diversas velocidades se obtienen curvas más o menos altas pero que conservan en todo momento las fluctuaciones normalmente apreciables en la insuflación úterotubaria.

8.- La auscultación del hemiabdomen inferior

durante la insuflación tubaria permite oír un soplo con variaciones sincrónicas con las ondas registradas en el quimograma.

9.- Cuando las trompas están ocluidas no se registran oscilaciones en la curva de presión.

10.- La extirpación de segmentos de trompa durante la insuflación tubaria muestra que la curva no varía sino momentáneamente cuando se resecan los dos tercios externos, disminuye la frecuencia de las contracciones cuando el corte se efectúa en la parte media del tercio interno, manteniéndose, sin embargo, la amplitud de las fluctuaciones manométricas, y, en cambio, no se registran oscilaciones cuando se cateteriza la porción intersticial de la trompa con una fina cánula rígida, lo cual parece demostrar que la existencia de ondas depende de que persista una porción de trompa activa.

11.- Hay evidencia radiológica del peristaltismo tubario.

12.- Experimentos hechos en úteros y trompas de conejas vivas permiten obtener curvas de contracción totalmente distintas para la actividad uterina y la tubaria.

Estos hechos están basados en numerosas observaciones clínicas y en diversos experimentos llevados a cabo por RUBIN y sus colaboradores, entre los que se destacan los trabajos de WIMPFHEIMER y FERESTEN<sup>35</sup> sobre el estudio comparativo de la actividad uterina y la tubaria en genitales de conejas vivas, los cuales han llevado a la conclusión de que las ondas de fluctuación manométricas apreciadas durante la insuflación úterotubaria son debidas al peristaltismo de la trompa, cosa aceptada ampliamente en la actualidad por numerosos autores como SIEGLER<sup>29</sup>, MAZER e ISRAEL<sup>16</sup>, MICULICZ-RADEKI<sup>18</sup>, MEAKER<sup>17</sup>, LANE-ROBERTS y colaboradores<sup>15</sup>, GEIST y colaboradores<sup>9</sup>, MOCQUOT<sup>19</sup>, PALMER<sup>20</sup>, BONNET<sup>3</sup>, BETTINOTTI<sup>2</sup>, CLAVERO<sup>6</sup> y muchos otros más.

En contra de esta opinión clásica, sin embargo, se ha levantado la voz de Sudamérica con STÁBILE<sup>31</sup> y BUNSTER<sup>4</sup>. El autor uruguayo<sup>31</sup> observó que al continuar la insuflación transuterina de gas después de seccionar las trompas al ras del útero, persistían las oscilaciones de la curva quimográfica. Más tarde, durante el Primer Convenio de la Sociedad Brasileira de Esterilidad *Pou Santiago* mencionó otra experiencia

de STÁBILE y sus colaboradores. Después de ligar las trompas al ras de los cuernos se punciona el útero con una aguja gruesa que penetre su cavidad y se inicia la insuflación transuterina de gas obteniéndose una curva manométrica baja sin oscilaciones. Sin discontinuar la insuflación se retira súbitamente la aguja y se aprecia que el gas escapa por el sitio puncionado, al mismo tiempo que se registra en el quimógrafo una curva con oscilaciones semejantes a las obtenidas en la insuflación úterotubaria.

Dada la trascendencia del hecho para la interpretación clínica de las curvas quimográficas obtenidas durante la insuflación úterotubaria, BUNSTER<sup>4</sup> de Chile consideró importante hacer una experimentación más amplia para aclarar estos hechos y recurrió a estos tres tipos de experiencias, todas ellas hechas en mujer durante intervenciones quirúrgicas practicadas bajo anestesia general con éter. El primer grupo de experiencias es la repetición de la primera experiencia de STÁBILE y en ellas el autor chileno comprobó que las gráficas de insuflación obtenidas con el aparato genital íntegro son prácticamente iguales a las que se registran después de seccionar las trompas al ras del útero, demostrando con ello que, para que se produzcan las oscilaciones quimográficas, se requiere solamente que persista lo que él llama "complejo cornual", es decir, la porción intersticial de las trompas asociada a la musculatura uterina vecina.

En el segundo grupo de experiencias insufló directamente las trompas seccionadas por medio de agujas introducidas en la luz de la porción ístmica tubaria, las cuales se conectaron por medio de tubos al aparato de RUBIN. Durante esta insuflación hecha directamente a través de trompas que conservaban aún toda su vascularización e inervación, el trazado quimográfico mostró oscilaciones mínimas totalmente diferentes a las que se observaron en las insuflaciones que precedieron a la sección de las trompas y a las que se produjeron al insuflar el útero, por vía cervical una vez seccionadas dichas trompas a nivel de los cuerpos uterinos, por lo cual pudo concluir que las porciones ístmica, ampular e infundibular de las trompas no intervienen en la producción de estas oscilaciones.

El tercer grupo, de dos casos, corresponde a mujeres

en quienes se reimplantaron ambas trompas a nivel de los cuernos uterinos después de reseca las porciones intersticiales de las trompas con un sacabocados circular de 5 m.m. de diámetro, quedando la porción ístmica de las trompas alojada en un conducto cilíndrico cornual. La insuflación transuterina de gas hecha un año después en la primera enferma y tres meses después de la operación en el segundo caso, reveló trompas perfectamente permeables y las curvas quimográficas mostraron oscilaciones regulares en todo semejantes a las de una mujer con trompas normales. El obtener oscilaciones manométricas en estos casos en que no existía la porción intersticial de las trompas y en las que quedó conservada la musculatura del cuerno uterino, ha llevado a este autor a la conclusión de que las fluctuaciones de la curva quimográfica normal son debidas a la acción de la musculatura del cuerno uterino, es decir, a la actividad de la porción uterina del "complejo cornual".

## COMENTARIO

La evidente disparidad de conclusiones a que conducen las experiencias de RUBIN y colaboradores por un lado, y las de STÁBILE y BUNSTER, por el otro, impone la necesidad de revisar concienzudamente este problema de fisiología tubaria, de cuya naturaleza depende la interpretación que deba darse a las gráficas manométricas obtenidas en el curso de la insuflación úterotubaria tan ampliamente utilizada en la clínica de las mujeres estériles.

Los hechos establecidos por RUBIN se basan en observaciones y experiencias cuidadosas que, sin embargo, tienen puntos débiles y bases a veces demasiado teóricas.

Prueba de ello es que al impugnar RUBIN<sup>24</sup> las observaciones de STÁBILE, no destruye el hecho en sí ni da una argumentación suficientemente sólida para dejar convencido. Además, la mayor parte de las experiencias de RUBIN y colaboradores demuestran la existencia del peristaltismo tubario, pero no prueban que sea éste el responsable de las oscilaciones manométricas apreciadas durante la insuflación.

Nosotros, por otra parte, hemos repetido las dos experiencias de STÁBILE y la segunda experiencia de BUNSTER habiendo comprobado totalmente sus

afirmaciones. Sin embargo, como acepta el mismo BUNSTER<sup>4</sup>, sus conclusiones son valederas únicamente para la trompa humana normal, sin que se pueda decir por ahora si la trompa parcialmente obstruida o con paredes alteradas puede modificar el mecanismo cornual al grado de suprimir o disminuir las oscilaciones.

Tratando de contribuir a la resolución de este problema estamos actualmente desarrollando un plan de trabajo que toma en cuenta estos diversos puntos y que incluye:

1.- La repetición de las experiencias de WIMPHEIMER y FERESTEN adaptadas a la mujer. Los demás hechos y experiencias expuestos por RUBIN comprueban únicamente la existencia del peristaltismo tubario pero no demuestran de ninguna manera que dicho peristaltismo, que en la especie humana es débil, sea el determinante de las oscilaciones de la curva quimográfica.

2.- La repetición de las experiencias de STÁBILE y BUNSTER en un importante número de casos con el fin de comprobar si es un fenómeno constante.

3.- La obtención de curvas quimográficas durante la insuflación úterotubaria hecha en el curso de laparotomías antes y después de infiltrar novocaína en los mesosalpinx para bloquear la innervación tubaria y antes y después de infiltrar los ganglios de FRANKELHAUSER para bloquear la innervación uterina, en aparatos genitales íntegros.

4.- La obtención de curvas manométricas en iguales condiciones antes y después de seccionar las trompas al ras del útero, en casos de trompas adheridas, ocluidas o bloqueadas.

Nuestros casos son muy pocos en la actualidad y no es por ahora útil ni conveniente analizar los resultados obtenidos que serán motivo de una comunicación posterior. Permítasenos, pues, por ahora, no sacar conclusiones en relación con este problema de fisiología tubaria.

## REFERENCIAS

- 1.- ANAPOLSKI.- Citado por BOURNE y WILLIAMS.- Recent advances in Obstetrics and Gynecology. Blakiston Co. 1946.
- 2.- BETTINOTTL, A. E.- Bol. Soc. Obst. y Gin. de Buenos Aires. 25: 639, 1946.
- 3.- BONNET, L.- J. Mount Sinai Hosp., 14: 141, 1947.

4. BUNSTER, E.- Trompa de Falopio y Esterilidad de Causa Tubaria. G. KRAFT, S. A. Buenos Aires, 1951.
- 5.- CELLA, C. y GEORGESCU, I.-Arch. Gynéc 165: 36, 1937.
- 6.- CLAVERO, A.- Esterilidad Matrimonial. Salvat Editores, S. A.- Barcelona, 1949. 7.- DANIEL M. C., MITESEN A., SOIMARU y GEORGESCU. D.- Rev. Franc. de Gynec., 28, 421, 1937.
- 8.- DYROFF, R.- Zeentr. F. Gynaek.- 49: 1890, 1925.
- 9.- GEIST, S. H., SALMON, U. J., y MINTZ, M. E.- Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 38: 783, 1938.
- 10.- GUNN, J. A.-Proc. Roy. Soc. London, 87: 551, 1913.
- 11.- GUTHMANN, H.- M. F. GEBURTSCH U. Gynaek., 59: 10, 1922.
- 12.- HARTMAN, C.- Citado por LANE-ROBERTS y COL. Sterility and Impaired Fertility. P. B. HOEBER, 1939.
- 13.- KOYE, J.- Citado por RUBIN, I. C. Utero-tubal insufflation. The C. V. Mosby Co. St. Louis, 1947.
- 14.- KOK, F., KLIN, WOCH.- 32: 1543, 1925.
- 15.- LANE-ROBERTS y COL.- Sterility and Impaired Fertility. P. B. HOEBER, 1939.
- 16.- MAZER, CH. ISRAEL.- S. L.- Menstrual Disorders and Sterility. PAUL B. HOEBER Inc. New York, 1941.
- 17.- MEAKER, S. R.- Human Sterility. Williams And Wilkins Co. Baltimore, 1934.
- 18.- MICULICZ-RADEKI, VON.- Zentr. f. Gynaek., 54: 2183, 1930.
- 19.- MOCQUOT, P. y PALMER R.- Soc. Gyn. et Obst., 25: 788, 1936.
- 20.- PALMER R.- Bull. Soc. Obst. et Gyn. de Paris: 26: 263, 1947.
- 21.- PARKER, G. H.- Trans. Roy. Soc. London; 219: 381, 1931.
- 22.- PINCSOHN.- Citado por RUBIN. Loe. Cit. 25.
- 23.- ROUGET C. -J. de la Physiol. de l'homme et des animaux. 1: 320, 1858.
- 24.- RUBIN, I. C. y BENDICK, J.- J. Roent. and Rad. Ther. 16: 251. 1926.
- 25.- RUBIN I. C.- Utero-tubal insufflation. The C. V. Mosby Co. Sto Louis, 1947.
- 26.- RUDDOCK, J. C.- Peritoneoscopy. South Surgeon, 8: 113, 1939.
- 27.- SECKINGER, D. L.- Bull. Johns Hopkin Hosp. 34: 236, 1923.
- 28.- SECKINGER, D. L. y CORNER, G. W.- Anat. Rec. 26: 299. 1923.
- 29.- SIEGLER, S. L.- Fertility in women. Lippincot Co. Philadelphia, 1944.
- 30.- SOBOTTA.- Citado por RUBIN, I. C. Loc. Cit. 25.
- 31.- STÁBILE, A.- Arch. Urug. de Med. Cir. y Esp. 18: 79, 1941.
- 32.- WESTMAN, A.- Acta Obst. et Gyn. Scandinav. 5: 7, 1926.
- 33.- WESTMAN, A.-Acta Obst. et Gyn. Scandinav. 8: 307, 1929.
- 34.- WESTMAN, A.- G. Obst. & Gyn. Brit. Emp. 44: 821, 1937.
- 35.- WIMPFHEIMER, S. y FERESTEN M.- Am J. Obst. & Gyn. 37: 405, 1939.
- 36.- WISLOCKI, G. B. y GUTTMACHER, A. F. Bull. Johns Hopkin Hosp. 35: 246, 1924.