



549 Editorial

Artículos originales

551 Propiedades de la zona del corioamnios que inducen la rotura prematura de membranas

M. en C. Noemí Meraz Cruz, Dr. Jorge Beltrán Montoya, Dr. Hugo Bustos López, Biol. Arturo Flores Pliego, Biol. Aurora Espejel, Dr. Gerardo Buendía Díaz, Dr. Felipe Vadillo-Ortega.

Se analiza la posibilidad de documentar diferencias funcionales en el corioamnios humano, comparando la zona donde la rotura ocurre con más frecuencia con rotura prematura de membranas, en comparación con otras zonas distantes del corioamnios y con zonas equivalentes de membranas fetales obtenidas de embarazos a término sin trabajo de parto.

Este trabajo obtuvo el Primer lugar de Investigación Básica en el 54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

559 Endometriosis y abatimiento de las características de la respuesta inmunológica citotóxica

Dr. César Ángel Hernández Guerrero, Dr. Rubén Tlapanco Barba, Dr. Carlos Ramos Pérez, Dra. Norma Velázquez Ramírez, Nutr. Denisse Castro Eguiluz, Dr. Arturo Cébulo Vázquez

Las mujeres con endometriosis tienen un ambiente peritoneal con menor capacidad efectora citotóxica, en comparación con las mujeres fértiles. El abatimiento de la capacidad efectora citotóxica aumenta conforme progresa la intensidad de la endometriosis.

Este trabajo obtuvo el segundo lugar de Investigación Básica en el 54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

575 Activación en el complejo de metaloproteinasas en la capacidad generativa foliculo-embionaria

Dr. Gerardo Barroso, Dra. Clara Corona de Lau, Dr. Julio González, QFB Lorena Loera, MVZ, Belén Aguilar, MVZ, Yadira Rosado, Dr. Humberto Reyes

El estudio del complejo de metaloproteinasas de matriz ha permitido observar no sólo la calidad ovular, sino también los procesos de fertilización y desarrollo embrionario.

Este trabajo obtuvo el tercer lugar de Investigación Básica en el 54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

585 Altas concentraciones de estradiol sérico en reproducción asistida

Dr. Eric Saucedo de la Llata, Dra. María Rosa Moraga Sánchez, Dr. Jorge Pezino Rodríguez, Dr. Armando Treviño, Dr. Manuel Leal Almeida, Dr. José Sepúlveda, Dra. Lidia Arenas Montezco, Dr. Genaro García Villafañá, Dr. Víctor Alfonso Batiza Resendiz,

Dr. Roberto Santos Haliscak, Dr. Pedro Galache Vega, Dr. Samuel Hernández Ayup.

La aplicación diaria de altas cifras de estradiol y GCH afecta los índices de gestación en pacientes en proceso de ICSI. Los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de estradiol entre 1,000 y 3,000 pg/mL. En ovodonación las altas concentraciones de estradiol no afectan los índices de gestación de las receptoras.

Este trabajo obtuvo el primer lugar de Investigación Clínica en el 54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia

590 Valores iniciales de la gonadotropina coriónica humana como pronóstico de la evolución del embarazo en reproducción asistida

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Ernesto Castela Morales, Dr. Samuel Karchmer Krivitsky

La determinación de las concentraciones de hCG mayores de 113 UI/L en el día 14 y de 403 UI/L en el día 16 ofrece adecuadas sensibilidad y especificidad como valores predictivos de la evolución del embarazo más allá de las 26 SDG, mientras que concentraciones de hCG de 270.42 y de 837.16 en los días 14 y 16, respectivamente, ofrecen una sensibilidad muy alta (91%) para embarazo múltiple.

Este trabajo obtuvo el segundo lugar de Investigación Clínica en el 54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

600 Pronóstico del índice estradiol-óvulo en la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Dr. Pedro Galache Vega, Dr. Eric Saucedo de la Llata, Dr. Armando Treviño Rodríguez, Dr. Roberto Santos Haliscak, Dr. Víctor Alfonso Batiza Reséndiz, Dra. Lidia Arenas Montezco, Dra. María Rosa Moraga Sánchez, Dr. José Sepúlveda González, Dr. Manuel Leal Almeida, Dr. Jorge Rodríguez Pezino, Dr. Genaro García Villafañá, Dr. Samuel Hernández Ayup S.

Es conveniente vigilar las concentraciones séricas de estradiol con esquemas de hiperestimulación ovárica menos agresivos para mejorar la calidad ovular.

Este trabajo obtuvo el tercer lugar de Investigación Clínica en el 54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia

Hace 54 años

605 La sinfisiotomía de Zárate

Dr. José Rábago

Artículo publicado en el Volumen IV, número 18-19, noviembre-diciembre de 1948, páginas 149-153.

609 Instrucciones para los autores



Contents

549 Editorial

Original articles

551 The zone where rupture occurs has different morpho-nutritional properties in comparison to chorioamnios in premature membranes rupture cases

M. en C. Noemí Meraz Cruz, Dr. Jorge Beltrán Montoya, Dr. Hugo Bustos López, Biol. Arturo Flores Pliego, Biol. Aurora Espejel, Dr. Gerardo Buendía Díaz, Dr. Felipe Vadillo-Ortega.

This work analyzes the possibility of documenting functional differences in human chorio-amnios, comparing the zone where rupture most frequently occurs in PMR with some other distant chorio-amnionic zones and with equivalent zones of fetal membranes obtained from nine month pregnancies which have not undergone labor.

We conclude that there is a chorio-amnionic zone in which connective tissue degradation is specifically induced and which coincides with the membrane zone in contact with the cervical os.

559 Women with endometriosis show a discouragement of immunology cytotoxic characteristics associated to the intensity of the pathology

Dr. César Ángel Hernández Guerrero, Dr. Rubén Tlapanco Barba, Dr. Carlos Ramos Pérez, Dra. Norma Velázquez Ramírez, Nutr. Denisse Castro Eguiluz, Dr. Arturo Cébulo Vázquez

To determine the immunology kind of response Th1 (cytotoxic) or Th2 (humoral) prevailing at peripheral and peritoneal environment at endometriosis women (ENW) an observational, transverse, analytical, retrospective, cases and controls study was carried out. Authors conclude that ENW show a peritoneal environment with a smaller immunology cytotoxic capacity, versus fertile women. The discouragement of the immunology cytotoxic capacity increases associated to the pathology intensity.

575 A correlation model in the activation components in the [TIMP/(MMP-3/stromelysin-1)] metalloproteinases complex in the follicle/embryonic generative capability in response to the exogenous administration of stimulating follicle hormone

Dr. Gerardo Barroso, Dra. Clara Corona de Lau, Dr. Julio González, QFB Lorena Loera, MVZ, Belén Aguilar, MVZ, Yadira Rosado, Dr. Humberto Reyes

To evaluate the impact of the enzymatic inhibition complex of metalloproteinases [TIMP(MMP-3 stromelysin-1)] in follicle/genesis processes and their ovule/embryonic subsequent development in stimulated cycles, a prospective longitudinal study was carried out. Authors conclude that the matrix metalloproteinases complex study has allowed observing a status not only in the ovular quality but in the embryonic development and fertilization processes too.

585 Influence of high concentrations of serum estradiol in the reproductive outcome of an assisted reproduction program

Dr. Eric Saucedo de la Llata, Dra. María Rosa Moraga Sánchez, Dr. Jorge Pezino Rodríguez, Dr. Armando Treviño, Dr. Manuel Leal Almeida, Dr. José Sepúlveda, Dra. Lidia Arenas Montezco, Dr. Genaro García Villafañá, Dr. Víctor Alfonso Batiza Resendiz, Dr. Roberto Santos Haliscak, Dr. Pedro Galache Vega, Dr. Samuel Hernández Ayup.

A retrospective, comparative study was carried out to analyze the influence of the levels of estradiol on the day of HCG in the pregnancy rate (PR) of ICSI and oocyte donation. The conclusion is that high estradiol levels at the day of HCG application affect the PR in patients submitted to ICSI. The best results were obtained with estradiol levels between 1,000 and 3,000 pg/mL. In oocyte donation the high concentrations of estradiol do not affect the PR of the receptors.

590 Evaluation of human chorionic gonadotropin initial values as a predictive variable in the prognosis of pregnancy evolution in an assisted reproduction program

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Ernesto Castelazo Morales, Dr. Samuel Karchmer Krivitsky

The objective of this study was to determine those predictive values of hCG which establish a prognosis concerning the evolution of pregnancy through the analysis of the values of this hormone on post-transference days 14 and 16, as well as to determine hCG values for multiple pregnancies. The authors conclude that the determination of hCG levels greater than 113 IU/L on day 14 and greater than 403 IU/L on day 16 offer adequate sensitivity and specificity as predictive factors for pregnancy evolution beyond the 26 GW, while hCG levels of 270.42 and 837.14, respectively, on days 14 and 16 offer a very high sensitivity (91%) for multiple pregnancy.

600 Prognostic values of oestradiol/oocyte rate in ICSI patients

Dr. Pedro Galache Vega, Dr. Eric Saucedo de la Llata, Dr. Armando Treviño Rodríguez, Dr. Roberto Santos Haliscak, Dr. Víctor Alfonso Batiza Resendiz, Dra. Lidia Arenas Montezco, Dra. María Rosa Moraga Sánchez, Dr. José Sepúlveda González, Dr. Manuel Leal Almeida, Dr. Jorge Rodríguez Pezino, Dr. Genaro García Villafañá, Dr. Samuel Hernández Ayup S.

A retrospective, comparative study was carried out in order to analyze the pregnancy rate in women who underwent Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) program depending of the oestradiol/oocyte index. The authors conclude that it is convenient to monitor the oestradiol blood levels to offer schemes of COH less aggressive to improve the oocyte quality. The oestradiol/oocyte index is a parameter adapted as a predictive value of pregnancy.

54 years ago

605 Symphysiotomy of Zárate

Dr. José Rábago

609 Instructions for authors



Editada por la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia

Fundada por la Asociación Mexicana de la Ginecología y Obstetricia en 1945

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

EDITOR

Dr. Carlos Fernández del Castillo S.*

EDITOR ASOCIADO

Dr. Jorge Delgado Urdapilleta*

EDITOR COORDINADOR

Dr. Ernesto Castelazo Morales*

CONSEJO EDITORIAL

Dr. J. Trinidad González Gutiérrez
Dr. José Manuel Septién González
Dr. Víctor Espinosa de los Reyes

Dr. Juan Rodríguez Argüelles
Dr. Carlos Mac Gregor S.N.
Dr. Samuel Karchmer K.

Dr. Efraín Vázquez Benítez
Dr. José Roberto Ahued Ahued
Dr. José Antonio Sereno Coló
Dr. Jesús Puente Tovar

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Jesús Leal del Rosal
(Chihuahua, Chih.)
Dr. Juan Antonio Bujáidar Bujáidar
Dr. Reynaldo Milla Villeda
(Durango, Dgo.)
Dr. Sergio Fajardo Dueñas
Dr. Oscar Flores Carreras
Dr. Emigdio Torres Farías
Dr. Luis Carlos Uribe Ramírez
Dr. Armando Vera Torres
(Guadalajara, Jal.)
Dr. Jorge González Durazo
(Hermosillo, Son.)
Dr. Antonio Gutiérrez Gutiérrez
(León, Gto.)
Dr. José de Jesús Montoya Romero
(Mazatlán, Sin.)
Dr. Fernando Gasque López
(Mérida, Yuc.)
Dra. Judith Ablanado Aguirre
Dr. Alberto Alvarado Durán
Dr. Manuel Álvarez Navarro
Dr. Carlos Aranda Flores
Dr. Aquiles R. Ayala Ruíz
Dr. René Bailón Uriza
Dr. Héctor Hugo Bustos López
Dr. Francisco Cabral Castañeda

Dr. Guillermo Díaz Barreiro
Dr. Paolo Di Castro Stringher
Dr. Julio Fernández Alba
Dr. Ángel García Alonso
Dr. Salvador Gaviño Ambríz
Dr. Fco. Javier Gómezpedroso Rea
Dra. Patricia Grether González
Dr. Pablo Gutiérrez Escoto
Dr. Juan Carlos Hinojosa y Ríos
Dr. Francisco Ibargüengoitia Ochoa
Dr. Valentín Ibarra Chavarría
Dr. Sebastián Iris de la Cruz
Dr. Alberto Kably Ambe
Dr. Roger Lara Ricalde
Dra. Teresita Leis Márquez
Dr. Victoriano Llaca Rodríguez
Dr. Mario López Llera
Dr. Miguel Ángel Mancera Reséndiz
Dr. José Niz Ramos
Dr. Javier Ortiz Ibarra
Dr. Carlos Quesnel García-Benítez
Dr. Gilberto Ramírez Cueto
Dr. Armando Ramírez Torres
Dr. José Antonio Ruíz Moreno
Dr. Carlos Salazar López Ortíz
Dr. Carlos Sánchez Basurto
Dr. Guillermo Santibáñez Moreno

Dr. Javier Santos González
Dr. Luis Senties Cortina
Dr. Claudio Serviere Zaragoza
Dr. Luis Simón Pereira
Dr. Gilberto Tena Alavez
Dr. Rubén Tlapanco Barba
Dr. César Trejo Ramírez
Dr. Roberto Uribe Elías
Dr. José Edmundo Valdés Macho
Dr. José Efraín Vázquez Martínez de Velasco
Dr. Manuel Villalobos Román
Dr. Carlos Villanueva Díaz
(México, D.F.)
Dr. Carlos Félix Arce
Dr. Samuel Hernández Ayup
Dr. Jesús Puente Tovar
Dr. Pedro Tonda Ribo
(Monterrey, N.L.)
Dr. Norberto Plascencia Moncayo
(Querétaro, Qro.)
Dr. Antonio de Jesús Briseño Sainz
(San Luis Potosí)
Dr. David Antonio Nava Muñoz
(Tijuana B.C.)
Dr. Pedro Coronel Brizio
(Xalapa, Ver.)

*SOCIOS DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE EDITORES DE REVISTAS BIOMÉDICAS, A.C. (AMERBAC) Y MIEMBROS DE LA WORLD ASSOCIATION OF MEDICAL EDITORS (WAME).



GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

Agrupaciones Federadas

Asociación Mexicana de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Monterrey, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Yucatán, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Guadalajara, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de "La Laguna", A.C.
Sociedad Potosina de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de León, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Tampico y Ciudad Madero, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Tijuana, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Mexicali, A.C.
Asociación Sinaloense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Colegio de Médicos Especialistas en Ginecología y Obstetricia del Estado de Chihuahua, A.C.
Colegio de Ginecólogos y Obstetras de Puebla, A.C.
Asociación Michoacana de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Asociación Veracruzana de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Monclova, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Ciudad Juárez, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Nuevo Laredo, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia del Estado de México, A.C.
Asociación Tabasqueña de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad Oaxaqueña de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad Xalapeña de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Aguascalientes, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Córdoba y Orizaba, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia del Estado de Guerrero, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia del Noreste de Tamaulipas, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Saltillo, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Celaya, Gto., A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Tuxtla Gutiérrez, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Toluca, A.C.
Sociedad Irapuatense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Ensenada, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Durango, A.C.
Sociedad Hidalguense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Asociación Victorensis de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Querétaro, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Mazatlán, Sinaloa, A.C.

Asociación de Gineco-Obstetricia de los Mochis, A.C.
Asociación Colimense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia del Sureste de Veracruz, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Piedras Negras, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Tuxpan, Ver., A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Ciudad Obregón, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia del Mayo, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Matamoros, Tamaulipas, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Quintana Roo, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de San Luis Río Colorado, Son., A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Morelos, A.C.
Asociación Vallartense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de la Costa de Chiapas, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Zacatecas, A.C.
Asociación Sudcaliforniana de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Campeche
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Tlaxcala, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Nayarit, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Zamora, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia del Sur del Estado de Chihuahua, A.C.
Asociación de Ginecoobstetras Guasave-Guamúchil, A.C.
Sociedad Cuauhtemense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Chilpancingo, Gro., A.C.
Colegio de Obstetricia y Ginecología de Salamanca, A.C.
Asociación de Ginecoobstetras del Sur de Jalisco, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Cd. Valles y Zona Huasteca, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Río Verde, S.L.P., A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Guaymas, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia del Norte de Sonora, A.C.
Colegio de Ginecólogos y Obstetras de Hermosillo, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Ciudad Delicias, A.C.
Colegio de Ginecoobstetras de Uruapan, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Matehuala, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Coatzacoalcos, A.C.
Colegio Ginecoobstétrico de Tehuacán, A.C.
Colegio Ginecoobstétrico de la Cuenca del Papaloapan, A.C.
Colegio Ginecoobstétrico del Norte del Edo. de Guerrero, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Poza Rica, Ver., A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de los Altos de Jalisco, A.C.



GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia, A.C.

Fundada en 1960

Comité Ejecutivo 2003-2005

Dr. Javier Santos González
Presidente

Dr. Roberto Uribe Elías
Secretario

Dr. René Bailón Uriza
Tesorero

Vocales

Dr. Manuel Álvarez Navarro
Región I

Dr. José Gómez Alarcón
Región IV

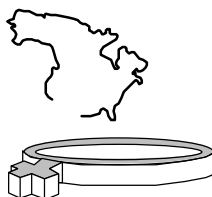
Dr. Héctor Alejandro González
Región II

Dr. Emigdio Torres Farías
Región V

Dr. Enrique Soto Canales
Región III

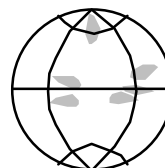
Dra. C. Martha Acosta Velázquez
Región VI

Dr. Marco A. Fuentes Ocampo
Región VII



Federación Latino Americana
de Sociedades de
Obstetricia y Ginecología
FLASOG
Fundada en 1952

Afiliada a:



FIGO
The International Federation
of Gynecology and Obstetrics
Fundada en 1954

INDIZADA EN: ARTEMISA, EMBASE CD/OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, EMBASE CD/PEDIATRICS, EXCERPTA MÉDICA, INDEX MEDICUS, ÍNDICE MÉDICO LATINOAMERICANO, LILACS, MEDLINE, SCIENCE CITATION INDEX, ULRICH, EBSCO.



Tarifas de suscripción anual 2003

Revista mensual

En la República Mexicana

Institucional (multilectores):	\$ 870.00
Personal:	\$ 850.00
Ejemplares ya publicados:	\$ 120.00

En el extranjero:

Institucional (multireaders):	\$ 160.00 dlls.
Personal:	\$ 155.00 dlls.

***La suscripción se puede iniciar en cualquier época del año**
Precios sujetos a cambio

Toda correspondencia debe dirigirse al editor/At'n. Sra. Bertha Schoelly de Larrondo. Ginecología y Obstetricia de México. Calle de Nueva York No. 38, Col. Nápoles, 03810 México, D.F. Tel. 5682-0156.

Realizada, comercializada y distribuida por NIETO EDITORES, SA de CV, Av. de las Tzinnias 10, col. Jardines de Coyoacán, México, DF, CP 04890. Tel.: 5678-2811, fax: 5679-6591. Impresa en: MPM, SA de CV, Manuel Sotero Prieto núm. 13, Circuito Científicos, Ciudad Satélite, Naucalpan, Estado de México, CP 53100.
Coordinación editorial: Evangelina Andraca Alcalá.

Suscripciones e informes

Sra. Bertha Schoelly de Larrondo

Calle de Nueva York No. 38, Col. Nápoles
Del. Benito Juárez, 03810, México, D.F.
Tels: 5682-0156, 5682-4823,
de 17:00 a 20:00 horas.
Fax: 5682 5601

Publicidad

Georgina González Tovar

Ejecutiva de ventas
Tel. 5678-2811.
Celular: 044-55-1047-16-45
E-mail: ggonzalez@nietoeditores.com.mx

Karla Armenta Tovar

Ejecutiva de ventas
Tel. 5678-2811.
Celular: 044-55-3077-47-54
E-mail: karmenta@nietoeditores.com.mx



Editorial

La revista GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO es el órgano impreso oficial de la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia que con casi sesenta años de publicación ininterrumpida goza de una reputación nacional e internacional reconocida en los medios científicos relacionados con esta rama de la medicina.

Los índices y registros internacionales más rigurosos la incluyen y eso es motivo de satisfacción para todos los miembros federados. Es fuente de consulta y referencia frecuente y sus miles de artículos publicados en sus páginas han contribuido sin duda alguna a la educación continua de incontables médicos y estudiantes de medicina. Durante los últimos veinte años, GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO contó con la calificada colaboración de la empresa Intersistemas que atinadamente dirige el Sr. Ing. Pedro Vera y sus experimentados colaboradores, destacando brillantemente la Dra. María del Carmen Ruiz. La relación de la Revista con esta importante empresa editorial ha llegado a su fin de manera cordial, amistosa y en los mejores términos. La gratitud que tiene la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia hacia estos queridos amigos editores será perdurable y ambas partes buscarán siempre la manera de incrementar los sólidos lazos de amistad establecidos en ambos sentidos a lo largo de tantos años de trabajo. A Intersistemas se les expresa por este conducto la gratitud y reconocimiento por su valiosa y destacada colaboración y por su enseñanza en los aspectos editoriales.

A partir de este número de noviembre del 2003, GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO será editada por una fuerte y certificada empresa editorial, NIETO EDITORES. La FEDERACIÓN MEXICANA DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA, a través de su Cuerpo Directivo presidido por el señor doctor Javier Santos González y los señores doctores Roberto Uribe Elías, Secretario y René Bailón Uriza, Tesorero, han concretado ya los compromisos morales y legales con esta compañía editorial que sobre seguro continuará acrecentando la buena fama de esta revista médica.

Así mismo, el Consejo Editorial de GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO expresa la más amigable bienvenida a NIETO EDITORES asegurando que todos continuaremos procurando lo mejor de nuestros esfuerzos para que el órgano oficial de la FEDERACIÓN MEXICANA DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA llegue a ser la mejor revista de la especialidad que se publique en lengua castellana.

Dr. Carlos Fernández del Castillo S
Editor



Propiedades de la zona del corioamnios que inducen la rotura prematura de membranas

M. en C. Noemí Meraz Cruz, Dr. Jorge Beltrán Montoya, Dr. Hugo Bustos López, Biol. Arturo Flores Pliego, Biol. Aurora Espejel, Dr. Gerardo Buendía Díaz, Dr. Felipe Vadillo-Ortega.

Resumen

Antecedentes. La ruptura prematura de membranas (RPM) es uno de los más serios problemas de salud pública a nivel mundial y su frecuencia es del 10% en todos los embarazos. La RPM tiene importantes efectos adversos en la morbilidad y mortalidad materno-fetal, pues se ha estimado que explica, en conjunto, 70% de la morbilidad y 40% de la mortalidad neonatal. El tratamiento de la RPM es empírico, dado que la causa es desconocida y apenas se inicia la descripción de su fisiopatogenia.

Material y métodos. Identificar, marcar y analizar la posibilidad de documentar diferencias funcionales en el corioamnios humano, comparando la zona en donde ocurre de modo más frecuente la rotura en casos con RPM, en contraste con otras zonas distantes del corioamnios y con zonas equivalentes de membranas fetales obtenidas de casos de embarazos a término sin trabajo de parto. Se analizó la actividad de metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), histología y topografía de distribución de MMP. La expresión de las MMP se cuantificó en medios de cultivo de explantes de fragmentos de membranas mediante ensayos inmunoenzimáticos específicos (ELISA) y por zimografía. Además, se realizó inmunohistoquímica para revelar la expresión de MMP en los diferentes tejidos. Se demuestra que el gradiente de actividad de MMP fue de mayor a menor, partiendo de la zona cercana a la os cervical en los tejidos obtenidos de casos con RPM. En las membranas con cesárea no se documentó un patrón particular y siempre fue menor que el observado en los tejidos con RPM. **Conclusión.** Existe una zona del corioamnios en la que se induce de manera específica la degradación de tejido conectivo y que coincide con la zona de las membranas en contacto con la os cervical.

Palabras clave: Corioamnios, ruptura prematura de membranas, morbilidad y mortalidad materno-fetal. (Meraz, et al. Propiedades de la zona del corioamnios que inducen la rotura prematura de membranas. Ginec Obst Mex 2003;71:551-558).

Premature membrane rupture (PMR) is one of the most serious public health problems in the world, occurring in 10% of all pregnancies. PMR has important adverse effects on maternofetal morbidity-mortality, as it has been estimated that it accounts on the whole for 70% and 40% of neonatal morbidity and mortality, respectively. PMR treatment is empirical, as its aetiology is unknown and its physiopathogenic description has just been initiated. This work analyzes the possibility of documenting functional differences in human chorio-amnios, comparing the zone where rupture most frequently occurs in PMR with some other distant chorio-amnionic zones and with equivalent zones of fetal membranes obtained from nine month pregnancies which have not undergone labor. The membrane zone which was nearest to the cervical os was identified and marked to be analyzed later for extracellular matrix metalloprotease (MMP) activity, histology and topographical MMP distribution. The MMP expression was quantitatively determined in explant culture media from membrane fragments using specific immuno-enzymatic essays (ELISA) and zymography. In addition, immuno-histochemistry methods were used to reveal MMP expression in the different tissues. This methods allowed us to show the existence of a decreasing MMP activity gradient, with the greatest value corresponding to the zone nearest to the cervical os in the membranes obtained from PMR cases. In membranes obtained from cesarean operations no characteristic pattern was documented and values were always lower than those obtained for PMR tissues.

We conclude that there is a chorio-amnionic zone in which connective tissue degradation is specifically induced and which coincides with the membrane zone in contact with the cervical os. ♦

Key words: Chorioamnios, premature membranes rupture, maternal morbidity-mortality. (Meraz Cruz, *et al.*, Properties of the chorioamnios zone inducing premature membranes rupture. *Ginec Obst Mex* 2003;71: 551-558).

Antecedentes

La ruptura prematura de membranas (RPM) se define como la salida de líquido amniótico, previa a la iniciación del parto, en embarazos mayores de 20 semanas o por lo menos dos horas antes del inicio del trabajo de parto.¹ Afecta 250,000 partos en Estados Unidos, siendo 40,000 de estos nacimientos antes de término.² La RPM origina diversas complicaciones: aumento de partos disfuncionales, corioamnionitis, parto por cesárea, hemorragia posparto, endomiometritis e infección neonatal.³ Además, la RPM se asocia con el nacimiento de productos pretérmino. En Estados Unidos se observó incremento del 9.4% en 1981 a 10.6% en 1991.⁴ El parto pretérmino tiene un importante costo psicológico y financiero para distintos países. Las complicaciones relacionadas con el parto pretérmino son impresionantes y explican 70% de la morbilidad neonatal y 40% de las muertes neonatales.⁵ En el análisis económico de estas cifras se estimó que los costos relacionados con el cuidado de la salud, educación

y cuidado de una cohorte de niños nacidos antes de tiempo (alrededor de 4,000,000) entre los 0 y 15 años de edad, fue de seis mil millones de dólares más que una cohorte comparativa de productos nacidos a término. En un análisis global de todos los gastos relacionados con salud en Estados Unidos, se estima que 10% de los costos relacionados con el cuidado de la salud se efectúan en niños con el antecedente de parto pretérmino o bajo peso al nacer. Los infantes pretérmino tienen riesgo de muerte incrementado y la morbilidad y mortalidad relacionada con la "inmadurez" de distintos órganos, lo que incluye problemas específicos, como síndrome de dificultad respiratoria, displasia broncopulmonar, ducto arterioso persistente, enterocolitis necrotizante, problemas de alimentación, apnea, retinopatía y sepsis.⁶

Hace poco se propuso un mecanismo fisiopatogénico para explicar la rotura prematura de membranas que involucra la activación anormal en el corioamnios de una familia de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP). Esta inducción en-

zimática resulta en la degradación activa de la matriz extracelular, lo que se manifestará como disminución del soporte mecánico del corioamnios.⁷ En específico, se ha demostrado que la RPM, en condiciones normales o patológicas, se vincula estrechamente con la expresión de un miembro específico de esta familia de enzimas, denominada gelatinasa de 92 kDa o MMP-9.⁸ Estos hallazgos, al margen del carácter explicativo del mecanismo bioquímico de la ruptura de membranas, permiten proponer el uso de esta enzima como un marcador del evento.⁹

La evidencia clínica señala que la mayor parte de las RPM sucede en áreas muy circunscritas del corioamnios, que generalmente parecen corresponder a la zona que se encuentra en contacto con la os interna y que circunstancialmente corresponde a la zona de mayor contacto con el exterior. Lo anterior podría reforzar la posibilidad de que un disparador del mecanismo de ruptura prematura sea la infección ascendente del tracto genital, el mismo estiramiento de la membrana durante el trabajo de parto pretérmino, o el estrés físico. Cualquiera que sea el mecanismo de estímulo inicial, el episodio se manifestará por la misma cascada de eventos fisiopatogénicos, a través de la degradación de colágena, aumento de MMP-9 y MMP-1, que son las únicas metaloproteinasas encontradas en células trofoblásticas y epiteliales de las membranas corioamnióticas.

La identificación de áreas con susceptibilidad diferencial a la ruptura podría tener relevancia en el entendimiento de los mecanismos que condicionan la RPM y sentar las bases para intervenir en estas zonas de “alto riesgo”. Hace poco, Quintero y sus colaboradores iniciaron el tratamiento de la RPM a través de fetoscopia, documentando por primera vez la zona de ruptura *in vivo*. El propósito de este estudio fue “sellar” la zona de ruptura con un concentrado de plaquetas y un crioprecipitado. El sello restauró la integridad del amnios sólo durante 72 h.¹⁰ Independientemente de este éxito parcial, la fetoscopia abre la posibilidad de identificar e intervenir en la zona de ruptura *in vivo* y así ensayar terapias dirigidas a la inhibición de los mecanismos de ruptura *in situ*.

Material y métodos

En este proyecto se estudiaron muestras de membranas corioamnióticas obtenidas de un grupo de mujeres con diagnóstico de ruptura prematura de membranas y de otro con embarazos a término, sin trabajo de parto y con indicación de intervención cesárea, vistas en el servicio de urgencias y tococirugía del Instituto Na-

cional de Perinatología. Se seleccionaron muestras de membranas de pacientes con los siguientes criterios de inclusión:

1. Mujeres entre 18 y 35 años de edad.
2. Pacientes con embarazos de 25 a 40 semanas de gestación, con ruptura prematura de membranas definida de acuerdo con los criterios del INPer.
3. Pacientes con embarazos de 37 a 40 semanas de gestación, sin evidencia clínica de trabajo de parto y con indicación de operación cesárea.

Se excluyó a las pacientes con cualquiera de las siguientes condiciones:

1. Datos clínicos de corioamnionitis: hipertermia, deshidratación, mal estado general, taquicardia materna o fetal, secreción purulenta por la vagina, líquido amniótico fétido, vagina con hipertermia o una combinación de los exámenes previamente señalados. Dos de los siguientes signos: temperatura > 38°C, leucocitosis > 15,000/mm³, aumento rápido en la cuenta de leucocitos, incremento repentino de formas inmaduras de leucocitos, útero irritable, líquido amniótico fétido, taquicardia fetal de 160 latidos/min, al menos en dos ocasiones consecutivas.
2. Oligohidramnios severo
3. Sufrimiento fetal agudo o crónico

Dada la estrecha relación de la RPM con cualquier proceso bacteriano, se controló la existencia de las siguientes bacterias en los compartimientos intramniótico, cervicovaginal y en cultivo directo de membranas y placenta:

Grampositivas, gramnegativas aerobias y anerobias y bacterias del tipo *Mycoplasma*. Se incluyen estreptococo del grupo B, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Bacteroides* spp y *Mobiluncus* spp.

Muestras biológicas. Antes de proceder a las maniobras que se describirán y durante su estancia en el consultorio de urgencias, se recabó el consentimiento informado de cada paciente.

A la llegada de las pacientes a la unidad tocoquirúrgica, se procedió a introducir por el canal cervical un espejo vaginal, y con ayuda de un hisopo empapado en violeta de genciana se marcó la zona de las membranas en contacto con la os cervical. Las membranas corioamnióticas se obtuvieron después de su expulsión o extracción en partos vaginales u operaciones cesáreas y se procesaron dentro de los siguientes 30 minutos posteriores a su extracción. En el laboratorio se identificó la zona teñida y se marcó como la zona 1; con ayuda de una regla milimétrica se midió una distancia de 10.0 cm desde el centro de la zona 1 y se marcó la

zona 2, lo mismo se hizo para la zona 3, que se localizó a 20 cm de la zona 1. Se limpiaron de debris y se cortaron círculos de 10 mm de cada zona, con ayuda de un sacabocado ("punch" dermatológico) bajo condiciones de esterilidad.

Cultivos de explantes de membranas corioamnióticas. Los fragmentos de membranas se sembraron en cajas de cultivo de 12 pozos y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con piruvato, suero fetal de ternera al 10 % y solución de antibiótico/antimicótico (GibcoBRL, Gaithersburg, USA). Los tejidos se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C, con atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % aire, con humedad relativa del 80 %. Los fragmentos se estabilizaron durante 12 h y luego se evaluó su viabilidad con la técnica de reducción de XTT. Los explantes estabilizados se pusieron en un proceso de eliminación de suero fetal; se realizaron tres cambios con medio fresco sin suero, en un lapso de 12 h, y después se siguió la incubación por otras 24 h. Se colectó el medio condicionado por cada explante para cuantificar la actividad de metaloproteinasas.

Cuantificación de metaloproteasas de matriz extracelular. Los cambios en la actividad enzimática en los medios de cultivo de los explantes de membranas, se evaluaron utilizando un sistema de zimografía con geles sustrato con gelatina. El sistema se hace cuantitativo utilizando concentraciones de MMP-9 recombinante que caen dentro de un rango de actividad lineal en una curva estándar. El cálculo de actividad

enzimática se realizó por densitometría de las bandas de actividad, con ayuda de un sistema de análisis de imágenes EagleEye (Stratagene, San Diego, CA).

De manera simultánea se cuantificó la actividad enzimática utilizando un sistema cuantitativo tipo ELISA, que incorpora un sistema de captura con anticuerpos monoclonales y uso de un sustrato específico para MMP-9 (Amersham, UK). La concentración de la enzima se expresa en ng/mL.

Western Blot. Los medios de cultivo de las diferentes zonas y membranas se sometieron a electroforesis en un sistema con SDS y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en un sistema húmedo.¹¹ Las proteínas transferidas se analizaron con un anticuerpo monoclonal antiMMP-9 humana y revelados con un sistema de quimioluminiscencia (Amersham, UK).

Inmunohistoquímica. Algunos fragmentos de los distintos segmentos de las membranas fetales de ambos grupos se fijaron en formaldehído pH 7.4 en PBS y se procesaron para inclusión en parafina y se cortaron para su análisis con técnicas de inmunohistoquímica estándar,¹² con un anticuerpo monoclonal específico para MMP-9 (Oncogene, Calbiochem, USA) y un sistema de detección con anticuerpo biotinilado y complejos avidina-peroxidasa (Vector, Burlingame, USA).

Análisis estadístico. Las concentraciones de MMP en los dos grupos se analizaron con estadística descriptiva y se compararon entre zonas y entre grupos con análisis de varianza.

FIGURA 1

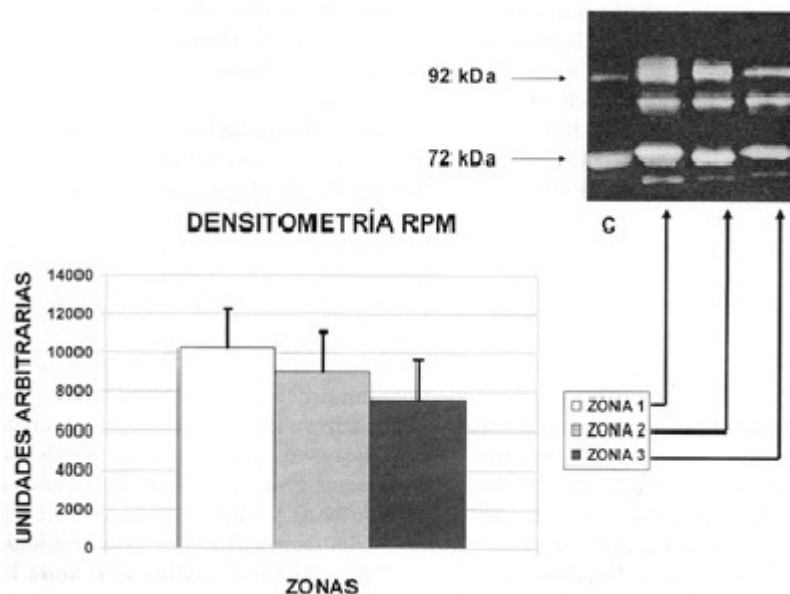
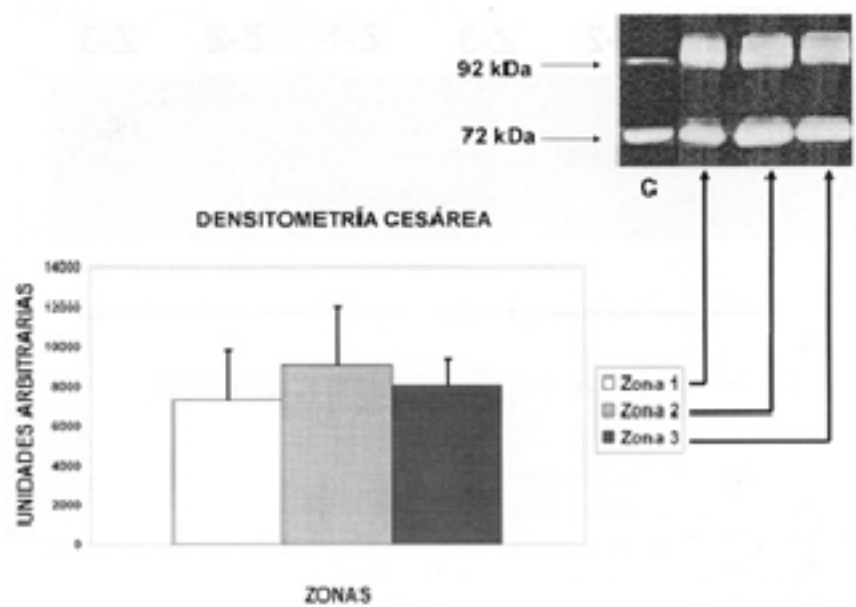


FIGURA 2

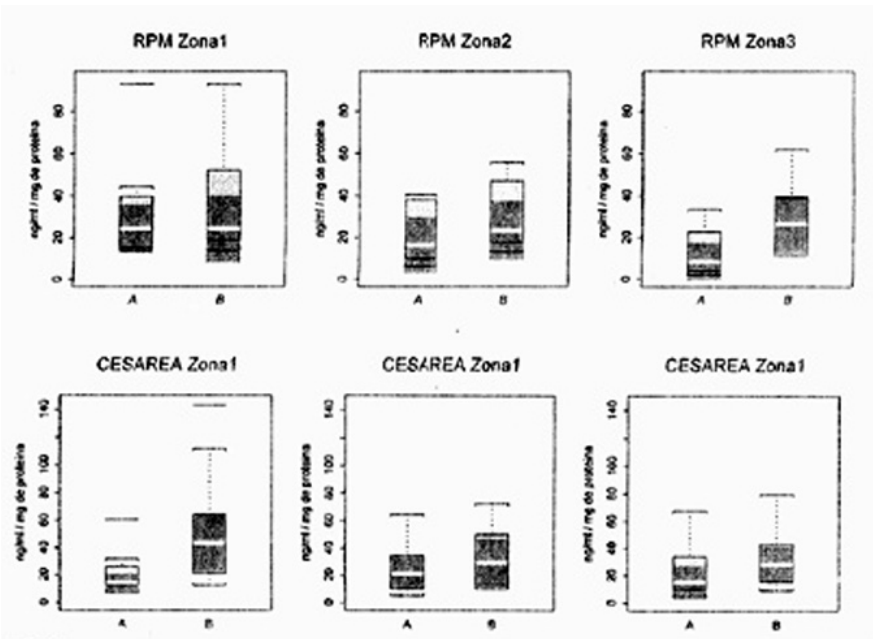


Resultados

La actividad enzimática medida por zimografía mostró mayor actividad de MMP-9 en las muestras provenien-

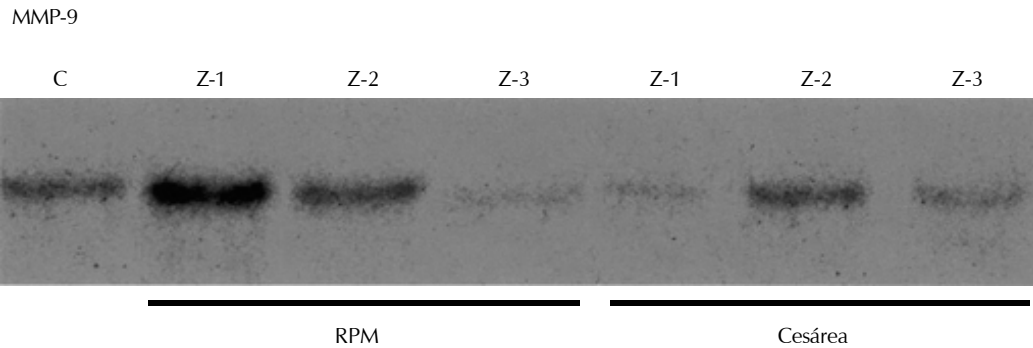
tes de la zona 1 de las membranas obtenidas de casos con RPM. Esta actividad disminuyó progresivamente en las áreas 2 y 3 de este grupo y permaneció en cantidad constante en las tres zonas de las membranas del

FIGURA 3



Actividad enzimática cuantitativa

FIGURA 4

*Western Blot*

grupo de cesárea (figuras 1 y 2). Una diferencia importante en la actividad detectada con este método fue la apreciación de existencia de las formas activas de MMP-9 en las muestras de RPM, pero no en las de cesárea (figura 1).

Al analizar la actividad enzimática con el método cuantitativo (figura 2) también se documentó la mayor actividad en la zona 1 de las membranas con RPM; la mayor proporción fue la cantidad de enzima activa sobre la latente para estos tejidos. En cambio, las membranas provenientes de casos de cesárea mostraron actividades totales de la MMP-9 equivalentes a las observadas en las de RPM, pero la mayor proporción de la enzima se encontraba en forma latente, tal y como ocurre con la zona 3 del grupo con RPM (figura 3). El ensayo fue lineal en el rango de 100 a 500 ng/mL.

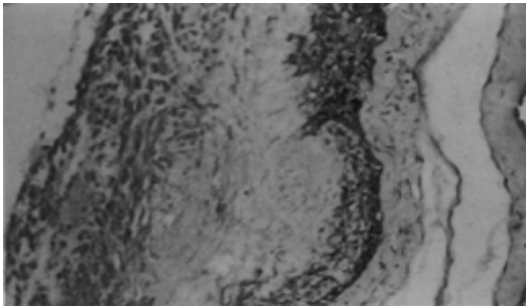
La cantidad de proteína inmunorreactiva, revelada por Western Blot, confirmó los mismos resultados observados con los métodos de actividad y así la mayor cantidad de enzima se localizó en la zona 1 de las membranas con RPM y la cantidad disminuyó progresivamente hasta la zona 3 (figura 4). En los medios de las membranas de casos con cesárea, la cantidad de la enzima fue menor y no mostró un patrón de gradiente. La inmunohistoquímica confirmó los hallazgos bioquímicos y los tejidos con menor reactividad a MMP-9 fueron los derivados de los casos de cesárea. En ellos se aprecian estructuras de amnios y corion conservadas, con células del corion, correspondientes a la zona trofoblástica, con tinción positiva para MMP-9. También fueron positivas algunas células del corion que se encuentran en la zona de contacto con el útero y que por su morfología podrían corresponder a células deciduales. No se observaron diferencias estructurales o de topografía de inmunorreactividad de MMP-9 entre las tres zonas analizadas (figura 5).

La morfología de las membranas obtenidas de casos con RPM mostró diferencias muy evidentes, en especial en las zonas 1 y 2. En tanto que la tercera zona, más cercana a la placenta, mostró una morfología normal; las otras dos áreas tuvieron manifestaciones de degradación de tejido conectivo, con hinchamiento de la zona del amnios y disgregación del material colagénico. Además de lo anterior, la reactividad de la MMP-9 fue claramente mayor en la zona 1, seguida de la 2 y casi nula reactividad en la zona 3, en coincidencia con los datos bioquímicos (figura 6).

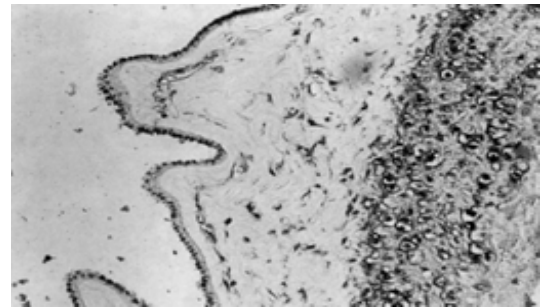
Discusión

En años recientes se ha incrementado el conocimiento de los mecanismos que condicionan el desarrollo de la RPM y, como resultado de ello, se acepta que el mecanismo central de daño es la degradación patológica del tejido conectivo de las membranas corioamnióticas, que ocurre desfasado de otros eventos del trabajo de parto, trayendo por consecuencia el debilitamiento progresivo de estas estructuras y su eventual rotura. La identificación de las señales que participan en la activación del sistema enzimático de metaloproteinasas de matriz extracelular es ahora otra frontera del conocimiento que debe ser entendida para poder intervenir en el desarrollo de la RPM. En este trabajo nos fue posible demostrar que la activación de la degradación del tejido conectivo que distingue a la RPM, es un fenómeno focalizado a la zona de la ruptura ya que, como se muestra en este trabajo, es en la zona más cercana a la os cervical donde se puede apreciar la activación completa de incremento de la cantidad de la enzima marcador, la MMP-9, así como la activación de su forma latente y las manifestaciones morfológicas asociadas,

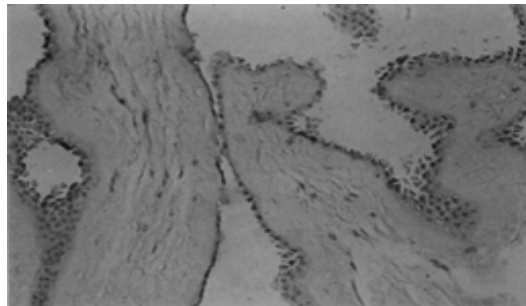
FIGURA 5



Zona 1



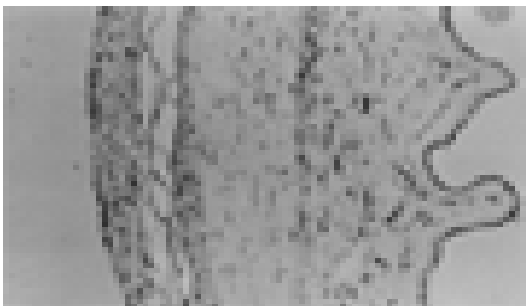
Zona 2



Zona 3

Cesárea

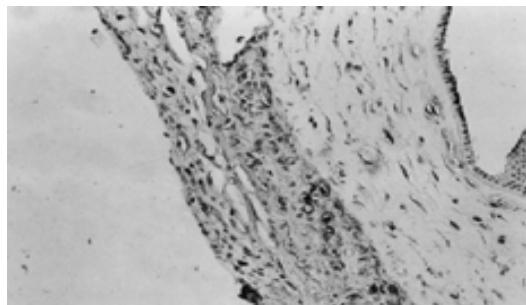
FIGURA 6



Zona 1



Zona 2



Zona 3

Rotura prematura de membranas

que muestran las consecuencias de la activación del sistema enzimático. Lo anterior permite postular la existencia de mecanismos locales de control del inicio del proceso y, de acuerdo con lo que hasta ahora sabemos, debería residir en la región del cérvix, al menos en el caso de la RPM. Los tejidos utilizados como controles en este estudio y que provenían de casos de cesáreas con embarazos a término, pero sin trabajo de parto, muestran que los sistemas enzimáticos involucrados coexisten hacia el término del embarazo, pero aún falta un elemento de activación que debería acompañar al desarrollo de la propia ruptura. Es este mecanismo de activación lo que debe ser caracterizado, y que se manifiesta por la existencia de enzimas activas, pues a la fecha no se conocen los pormenores moleculares de este proceso¹³ y así poder entender las diferentes fases que operan en el desarrollo de la degradación del tejido conectivo del corioamnios durante su rotura patológica. Quizá del conocimiento de estos mecanis-

mos se desprenderá una serie de blancos posibles de intervención, que permitan detener o impedir la RPM.

En este trabajo se confirman observaciones previas de nuestro grupo¹⁴ y de otros en el mundo,¹⁵ que proponen que el incremento de actividad de diferentes MMP, coincide con el proceso de rotura. Es claro que los grupos celulares involucrados en la síntesis y secreción de MMP-9, incluyen a casi todas las poblaciones celulares del amnios y corion para el caso de la RPM, en tanto que en el embarazo normal, aquí representado por las muestras de tejido de cesáreas, da la impresión de que el proceso es mucho más controlado y depende del epitelio amniótico y de las células trofoblásticas.

Este trabajo aporta pruebas de que la zona que se rompe durante la RPM es diferente en su capacidad funcional de degradación del tejido conectivo a otras áreas del corioamnios de la misma membrana. ♦

Referencias

1. Normas y Procedimientos de Obstetricia y Ginecología. Instituto Nacional de Perinatología. 2000. México: Marketing y Publicidad de México.
2. Polzin WJ, Brady K. The etiology of premature rupture membranes. *Clin Obstet Gynecol* 1998;41(4):810-6.
3. National Center for Health Statistics. Vital Statistics. Advanced report of final natality Statistics 1991. Washington D.C. US. Department of Health and Human Services. 1993.
4. Gregory KD. Preterm birth prevention programs and other interventions to decrease preterm birth in multiple gestations. *Infertil Reprod Med Clin North Am* 1998;9:475-93.
5. Dolfus C, Paletta M, Siegel E. Infant mortality. A practical approach to the analysis of the leading causes of death and risk factors. *Pediatrics* 1990;56:176-83.
6. Fonaroff AA, Wright LL, Stevenson DK. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. May 1991 through December 1992. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1423-31.
7. Vadillo-Ortega F, González G, Furth E, Lei H, Muschel R, Stetler W, Strauss J. 92 kDa Type-IV Collagenase (Matrix Metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 1995;146:148-56.
8. Lei H, Vadillo-Ortega F, Paavola L, Strauss J. 92 kDa gelatinase is induced in rat amnion immediately prior to parturition. *Biol Reprod* 1995;53:339-44.
9. Vadillo-Ortega F, Hernández MA, González-Ávila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss J. 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;174:1371-6.
10. Quintero RA, Abuhamad A, Hobbins JC, Mahoney MJ. Transabdominal thin gauge embryofetoscopic: A technique for early prenatal diagnosis and its use in the diagnosis of a case of Meckel Gruber Syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1552-7.
11. Towbin H, Stahelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 76: 4350-4.
12. Paavola LG, Furth EE, Delgado V, Boyd CO, Jacobs CC, Lei H, Strauss III JF. Striking changes in the structure and organization of rat fetal membranes precede parturition. *Biol Reprod* 1995; 53: 321-38.
13. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999;107:38-44.
14. Meraz-Cruz N, Molina DG, Vadillo-Ortega F. Cambios secuenciales de metaloproteinasas de matriz extracelular durante la gestación y el trabajo de parto en el corioalantoides de la rata. *Rev Invest Clin* 2002;54:342-8.
15. Rowe TF, King LA, MacDonald PC, Casey ML. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:915-21.



Endometriosis y abatimiento de las características de la respuesta inmunológica citotóxica

Dr. César Ángel Hernández Guerrero,¹ Dr. Rubén Tlapanco Barba,² Dr. Carlos Ramos Pérez,³ Dra. Norma Velázquez Ramírez,³ Nutr. Denisse Castro Eguiluz,¹ Dr. Arturo Cébulo Vázquez⁴

Resumen

Objetivo. Determinar el tipo de respuesta inmunológica Th1 (citotóxica) o Th2 (humoral) imperante en el ambiente periférico y peritoneal de mujeres con endometriosis (MEN). **Tipo de estudio.** Observacional, transversal, analítico, retrospectivo, de casos y controles. **Material y métodos.** A partir de linfocitos T cooperadores y citotóxicos obtenidos de líquido peritoneal (LP) y sangre periférica (SP) se determinó intracelularmente la producción de IFN- γ e IL-2 en MEN. Se determinó la concentración de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en LP y SP de MEN y mujeres fértiles (MFER). Los resultados obtenidos se analizaron por ANOVA paramétrica, t de Student y U de Mann-Whitney, con una $p < 0.05$ como diferencia estadística. **Resultados.** El ambiente peritoneal de las MEN muestra menor concentración de IL-2 e IFN- γ en los linfocitos T, como en el LP de MEN. La disminución se vincula con menor porcentaje de linfocitos T cooperadores y NK ($p < 0.05$ en todos los casos), comparado con MFER. Este fenómeno se observa más acentuado en los estadios III y IV de la enfermedad. **Conclusiones.** Las mujeres con endometriosis tienen un ambiente peritoneal con menor capacidad efectora citotóxica, en comparación con MFER. El abatimiento de la capacidad efectora citotóxica aumenta conforme progresa la intensidad de la endometriosis. ◇

Palabras clave: Endometriosis, respuesta inmunológica, citotoxicidad.

(Hernández Guerrero CA. Endometriosis y abatimiento de las características de la respuesta inmunológica citotóxica. Ginec Obst Mex 2003;71:559-574).

Instituto Nacional de Perinatología.

¹Departamento de Ultramicroscopía. ²Subdirección de Ginecoobstetricia. ³Departamento de Planificación Familiar.

⁴Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal.

**54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Segundo lugar de Investigación Básica**

Abstract

Objective. To determine the immunology kind of response Th1 (cytotoxic) or Th2 (humoral) prevailing at peripheral and peritoneal environment at endometriosis women (ENW). **Study design.** Observational, transverse, analytical, retrospective, cases and controls. **Material and methods.** Cooperative and cytotoxic lymphocytes obtained from peritoneal fluid (PF) and peripheral blood (PB) were used to determine IFN- γ and IL-2 intracellular synthesis at ENW. IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 concentration were determined at PF, PB at ENW and fertile women (FERW). Results were analyzed by ANOVA, t student and Mann-Whitney tests, accepting $p < 0.05$, as a statistic difference. **Results.** Peritoneal environment of ENW shows a smaller intracellular synthesis of IFN- γ and IL-2 at cooperative and cytotoxic T lymphocytes, as in the PF at ENW. The decrease is associated to a smaller percentage of activated, cooperative T lymphocytes and NK cells ($p < 0.05$, at all the variable), versus FERW. This phenomenon is observed more stressed at the III and IV pathology degree. **Conclusions.** ENW show a peritoneal environment with a smaller immunology cytotoxic capacity, versus FERW. The discouragement of the immunology cytotoxic capacity increases associated to the pathology intensity. ◇

Key words: Endometriosis, immunology response, cytotoxicity.

(Hernández Guerrero CA. Endometriosis and discouragement of immunology cytotoxic characteristics. Ginec Obst Mex 2003;71:559-574).

Introducción

La endometriosis se define como la presencia de glándulas endometriales y estroma fuera de la cavidad uterina.¹ Es uno de las alteraciones ginecológicas benignas más comunes que afecta aproximadamente al 5 % de la población general. En mujeres infértiles la prevalencia reportada es entre 25 y 50 %.¹

El crecimiento del tejido endometrial fuera de la cavidad uterina ocurre frecuentemente sobre los ovarios, las trompas de Falopio, la vejiga, el intestino, el peritoneo y en la musculatura uterina. Al igual que el tejido endometrial eutópico, los implantes ectópicos reaccionan a los cambios hormonales que controlan la menstruación. Proliferan, se descaman y sangran sin que este tejido sea expulsado del organismo, por lo que es muy probable que las células y tejido descamado induzcan irritación local, un estado proinflamatorio que puede dar lugar a la aparición de tejido fibrótico, cicatrices y adherencias.²

Puesto que durante la etapa exfoliativa del endometrio un porcentaje muy alto de mujeres presentan menstruación retrógrada hacia el peritoneo,^{3,4} las células y el tejido endometrial recuperado de esta cavidad expresan la capacidad de implantarse y proliferar; al parecer, se trata de una situación normal durante la vida reproductiva de la mujer. Diversos grupos de inves-

tigación en el mundo⁵⁻⁸ han planteado y reportado pruebas que indican la existencia de alteraciones inmunológicas de tipo celular y soluble, en el microambiente peritoneal de mujeres con endometriosis, las cuales parecen tener relación con una deficiente capacidad para eliminar células y tejido endometrial que llega periódicamente al peritoneo.

En sistemas *in vitro*, las mujeres con endometriosis muestran menor capacidad citotóxica en contra del tejido endometrial por parte de células asesinas naturales (NK), obtenidas de sangre periférica en comparación con el mismo grupo celular proveniente de mujeres fértiles.^{9,10} Las células NK desempeñan un papel muy importante en la eliminación de células dañadas y potencialmente cancerosas,¹¹ por lo que se especula que su participación en la eliminación de células y tejido endometrial de la cavidad peritoneal es preponderante, pues emplea mecanismos citotóxicos no restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

El abatimiento de la actividad citotóxica también se ha observado en linfocitos T cooperadores (CD3 + /CD4 +) y T citotóxicos (CD3 + /CD8 +) obtenidos de mujeres con endometriosis a partir de sangre periférica, mismos que ejercen menor citotoxicidad sobre células endometriales autólogas y heterólogas en cultivo, en comparación con los valores de citotoxici-

dad mostrados por las mismas estirpes celulares obtenidas de mujeres sin endometriosis.¹²⁻¹⁴

El potencial citotóxico disminuido de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, observado en las mujeres con endometriosis, parece estar condicionado por la alteración de citocinas y moléculas, que en forma local se encargan de regular la respuesta inmunológica, puesto que es posible restaurar la capacidad lítica en contra de células endometriales, al estimularlas con interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2) cuando se realizan los experimentos de citotoxicidad.¹⁵

A este respecto se ha examinado la composición bioquímica del líquido peritoneal (LP) en mujeres con endometriosis, y se han identificado diferencias en la concentración de diversas citocinas, como interleucina (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), prostaglandinas, hormonas, etc. Estas citocinas son producidas por macrófagos, linfocitos T, células NK y por células locales de órganos y estructuras del peritoneo, las cuales juegan un papel preponderante en los mecanismos de regulación de la respuesta inmunológica local y posiblemente sistémica.¹⁶⁻¹⁹

En este rubro se ha demostrado que los macrófagos y las células involucradas en el reconocimiento y eliminación de células muertas, dañadas y restos de ellas, se encuentran en mayor porcentaje y grado de activación en el ambiente peritoneal de mujeres con endometriosis, en comparación con el número y activación celular de mujeres fértiles.^{20,21} La activación de este grupo celular conduce a una mayor síntesis de diversas moléculas (citocinas, interferones, radicales libres, prostaglandinas, etc.) que se cree están relacionadas con el padecimiento, sin tenerse del todo comprendido el mecanismo involucrado. Cuando los macrófagos se activan aumenta la expresión de una enzima citocromo que cataliza la generación de formas reactivas de nitrógeno, específicamente ON; los macrófagos son la principal célula inmunológica productora de ON.²² El TNF- α induce a los macrófagos a activar la transcripción de los genes de la sintasa de óxido nítrico (iNOS), enzima encargada de producir dicho nitrógeno activo.²³

Esta característica cobra especial atención, puesto que el estado proinflamatorio identificado en el ambiente peritoneal de mujeres con endometriosis se puede relacionar con la activación de los macrófagos locales, que cuando se activan entran en el proceso de estallido respiratorio, donde sintetizan y liberan grandes cantidades de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno. Esta característica puede tener relación con la regulación de la respuesta inmunológica, ya que se ha observado que el ON es un potente inductor de la producción de IL-4 por parte de los linfocitos T coopera-

dores, citocina típica y respuesta Th2.^{23,24} Asimismo, el óxido nítrico es un potente inhibidor de la respuesta citotóxica o TH1, pues abate la síntesis de IFN- γ en las células NK y linfocitos T cooperadores.

Estas pruebas han permitido proponer la existencia de un ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis, que condicione un abatimiento o disminución de los mecanismos efectores citotóxicos de la respuesta inmunológica. Este planteamiento se basa en las características efectoras de la respuesta inmunológica, ya que ejerce su actividad a través de dos grandes brazos. El brazo celular está modulado por la subpoblación de linfocitos T cooperadores denominados tipo Th1, que promueven, principalmente, actividad citotóxica y reciben esta clasificación debido a la síntesis aparentemente restringida de las citocinas IL-2, interferón-gamma (INF- γ) y linfoxina (LT). El brazo humoral es modulado por la subpoblación de linfocitos denominados Th2, quienes a partir de la síntesis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimulan la producción de anticuerpos por células plasmáticas. Sobresale el mecanismo utilizado para regular ambos tipos de respuesta, ya que ésta se lleva en forma cruzada, pues las citocinas del tipo Th1 abaten la actividad efectora humoral o Th2, y las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13, son potentes inhibidores de la respuesta citotóxica o Th1.^{25,26}

Es posible que una síntesis diferente de citocinas y moléculas involucradas en la regulación de la respuesta inmunológica determine mayor concentración de citocinas tipo Th2 y/o menor concentración de citocinas Th1, lo que condiciona menor capacidad citotóxica efectora local por parte de las células involucradas en esta función. Los datos reportados en la literatura muestran valores aislados sobre la presencia de algunas citocinas o moléculas relacionadas; sin embargo, hasta donde sabemos no existe un análisis completo que evalúe la presencia de características celulares, citocinas del tipo Th1 y Th2 presentes en LP y SP, con la intención de definir con precisión si las mujeres con endometriosis muestran una característica inmunológica determinada en el ambiente peritoneal y/o periférico.

Objetivo general

Identificar el tipo de respuesta inmunológica imperante (Th1/Th2) en el ambiente peritoneal y periférico de mujeres estériles con endometriosis y su relación con derivados del óxido nítrico.

Los objetivos específicos son:

1. Identificar la producción de citocinas intracelulares IL-2 e INF- γ (respuesta Th1) e IL-4 (respuesta

- Th2) en linfocitos T cooperadores y T citotóxicos, obtenidos de líquido peritoneal y sangre periférica de mujeres con y sin endometriosis.
2. Determinar por técnica de ELISA la concentración de IL-2 e INF- γ (respuesta Th1), así como de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2) en la sangre periférica y el líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.
 3. Determinar la concentración del derivado de óxido nítrico (nitrito) en plasma y líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis.
 4. Correlacionar la concentración de óxido nítrico con el tipo de respuesta inmunológica (Th1 o Th2) observada en mujeres con y sin endometriosis.

Material y métodos

Tipo de estudio. Investigación observacional con diseño transversal, con características de estudio en relación con el método de observación transversal. En cuanto al tipo de análisis fue analítico y por lo que toca a la temporalidad, retrospectivo.

Población de estudio. A partir de la Clínica de Esterilidad del Instituto, donde se efectuó el trabajo, se generó el grupo de estudio que comprende mujeres estériles con endometriosis diagnosticada con videolaparoscopia y estadio clínico de la enfermedad, de acuerdo con la clasificación de la AFS.²⁷ La obtención de productos biológicos se realizó en la fase proliferativa del ciclo menstrual (días 12 a 16) mediante aspiración de líquido peritoneal del fondo del saco antes de efectuar algún procedimiento local. La muestra de sangre periférica se tomó a partir de una punción venosa del antebrazo al momento de efectuar el procedimiento quirúrgico.

Tamaño de la muestra. Con una fórmula para dos medias se calcularon las de dos grupos independientes: mujeres estériles con endometriosis y mujeres sanas fértiles. En el supuesto de que las desviaciones estándar en las dos poblaciones sean semejantes, al igual que el tamaño de las muestras en los dos grupos, tomando como la magnitud de la diferencia en el porcentaje de linfocitos T CD4+ que sintetizan IFN- γ en LP, entre mujeres sanas fértiles y mujeres con endometriosis, se obtuvo un tamaño de muestra de 22 mujeres por grupo.

Grupo testigo. Las muestras biológicas del grupo testigo se obtuvieron a partir de mujeres sanas fértiles con paridad satisfecha, que asistieron a la clínica de planificación familiar del Instituto donde se realizó el estudio, a quienes como método anticonceptivo se practicó obstrucción tubaria bilateral. La obtención de

productos biológicos se realizó en la fase proliferativa del ciclo menstrual (días 12 a 16), aspirando el líquido peritoneal del fondo de saco antes de efectuar la obtención de las trompas. La toma de la sangre venosa se realizó al momento de la cirugía.

Criterios de inclusión al grupo con endometriosis. Mujeres estériles que hayan asistido a la clínica de esterilidad, a quienes se realizó una videolaparoscopia exploratoria y en donde el factor masculino de esterilidad se haya excluido. En quienes se obtuvo líquido peritoneal sin contaminación aparente de sangre periférica, al momento de la laparoscopia. En las que se determinó endometriosis peritoneal por laparoscopia, y el grado del padecimiento fue clasificado por el grupo de especialistas.

Criterios de exclusión al grupo con endometriosis. Mujeres en quienes se identificó enfermedad pélvica inflamatoria aguda al momento de realizar la videolaparoscopia. Mujeres con algún antecedente autoinmune en su historia clínica. En las que al momento de la videolaparoscopia no fue posible coleccionar líquido peritoneal. En las muestras en quienes fue posible obtener líquido peritoneal, pero la viabilidad celular fue menor al 80 %, y/o el número de células fue menor a 3,000,000/mL.

Criterios de inclusión para el grupo testigo. Obtención de líquido peritoneal sin contaminación aparente de sangre periférica, al momento de la laparoscopia. Ausencia de pruebas laparoscópicas de endometriosis al momento de realizar la cirugía.

Criterios de exclusión al grupo testigo. Mujeres con manifestación de algún antecedente autoinmune en su historia clínica. Aquellas en quienes al momento de la videolaparoscopia no fue posible coleccionar líquido peritoneal. Pacientes en quienes no fue posible obtener líquido peritoneal, pero la viabilidad celular fue menor al 80 % o el número de células fue menor a 3,000,000/mL.

Determinación de subpoblaciones de linfocitos e identificación de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo. La identificación de las subpoblaciones de linfocitos se llevó a cabo mediante citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de superficie (CD), conjugados con fluorocromos. El Cuadro I describe la mezcla de anticuerpos monoclonales usados, así como el tipo celular que detectaron.

Después de coleccionar el líquido peritoneal en el quirófano, se transportó al laboratorio e inmediatamente se procesó. El volumen obtenido se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se fraccionó en alícuotas de 500 μ l y se almacenó a 20°C. Al mismo tiempo se agregó medio RPMI-1640 (Gibco BRL) sin indicador de pH, adicionado con albúmina

CUADRO I. Anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, empleados en la tinción de superficie de células para citometría de flujo

Anticuerpo (anti CD)	Fluorocromo	Subpoblación identificada
CD3	PE-Cy5	Linfocitos T totales
CD4	FITC	Linfocitos T inductores
CD8	FITC	Linfocitos T citotóxicos
CD3		
CD19/CD45	FITC	
PE/PE-Cy5	Linfocitos B	
CD3/HLA-DR	FITC/PE	Linfocitos T activados
CD3/CD16+CD56	FITC/PE	Células NK
CD45/CD14	FITC/PE	Macrófagos

FITC: Isotiocinato de fluoresceína. PE: Ficoeritrina. PE-Cy5: Ficoeritrina Cy5.

sérica bovina al 2 %, a la pastilla celular del LP para alcanzar un volumen de 700 µL, con la intención de lavar y mantener en condiciones de máxima viabilidad a las células peritoneales colectadas. Se determinó el número y viabilidad de las células peritoneales obtenidas, mediante exclusión de un colorante vital (azul triptán al 0.5). Las muestras que contenían como mínimo un millón de células por mililitro, y una viabilidad mayor al 90 %, se emplearon para realizar la identificación por citometría de flujo.

Para identificar subpoblaciones de linfocitos en el compartimiento materno y peritoneal, se colocaron alrededor de 100,000 células provenientes de líquido peritoneal o 20 µL de sangre periférica, las cuales se pusieron en contacto con 4 µL de los anticuerpos monoclonales específicos para cada subpoblación celular, durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Al término de la incubación se adicionaron 250 µL de solución de lisis (FACS Lysing Solution), con la intención de eliminar las células hemáticas presentes, y permitir actuar a la solución durante 15 minutos. Posteriormente se hizo la adquisición y análisis de las muestras, utilizando un citómetro de flujo Coulter Epics Altra en un lapso no mayor de 48 horas.

Para identificar el fenotipo de actividad inmunológica que expresan los linfocitos T cooperadores (CD4+/CD3+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+/CD3+), obtenidos del compartimiento peritoneal y periférico, se emplearon anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina, dirigidos contra las citocinas: INF-γ, IL-2 e IL-4. Se siguió la siguiente metodología: se incubaron 100,000 células provenientes de líquido peritoneal o 20 µL de sangre periférica, durante 15 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos de superficie: anti-CD3 + anti-CD4, y/o anti- CD3 + anti- CD8. Posteriormente se agregaron 40 µl de solución fijadora Intra-Prep 1, durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se agregaron 40 µl de solución

permeabilizadora IntraPrep 2, durante cinco minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente la presencia de las citocinas intracelulares, se determinó mediante citometría de flujo con el equipo antes descrito.

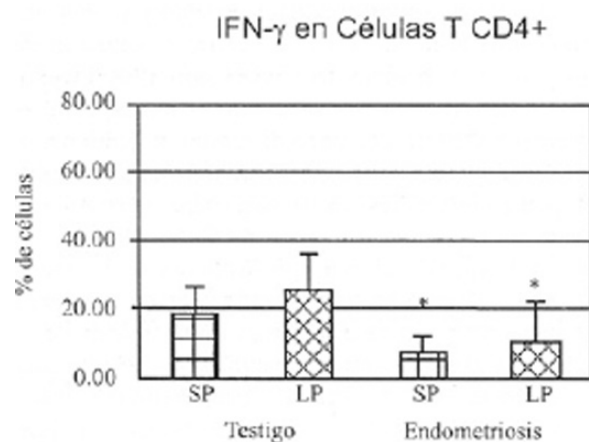
Cuantificación de citocinas por ELISA. La determinación de citocinas solubles (INF-γ, IL-2, IL-4 e IL-10) en líquido peritoneal y sangre periférica, se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos cuantitativos (ELISA tipo “sandwich”), desarrollados en el laboratorio, con reactivos comerciales (estándar de la citocina, anticuerpo monoclonal de captura y anticuerpo biotinilado de detección Pharmingen). Se usó la siguiente metodología:

Con el uso de placas de 96 pozos con superficie absorbente, se colocaron 50 µl por pozo del anticuerpo de captura, que reconoce específicamente a la citocina de interés, éste se diluyó a una concentración de 2 µg/mL en la solución de unión. La placa se selló y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se retiró la solución de unión y se lavó la placa tres veces con PBS/Tween. Con la intención de bloquear las uniones inespecíficas se agregaron 200 µL por pozo de solución de bloqueo. Posteriormente se colocaron 100 µL por pozo de estándares, controles y muestras desconocidas, permitiendo su interacción durante 12 horas a 4°C. Se adicionaron 100 µL del segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) conjugado con biotina en cada pozo de las placas a una concentración de 2 µg de proteína/mL de solución, los cuales se dejaron en incubación durante una hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la placa de ELISA se lavó exhaustivamente con solución de lavado, agregándose el conjugado de estreptavidina/fosfatasa alcalina diluida 1:1000, mismo que se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo de color se hizo mediante la utilización del cromógeno para-nitrofenilfosfato, determinando la absorbancia de las muestras y curva es-

tándar en un lector de ELISA marca Dynatech a 450 nanómetros de longitud de onda. La concentración de las citocinas en las muestras problema se determinó mediante interpolación de la absorbancia obtenida, en la curva de calibración de absorbancia contra la concentración de la citocina estándar, realizada en cada ensayo para ambas citocinas. En todos los casos se analizó el coeficiente de correlación de la curva de calibración obtenida, así como el coeficiente de variación interensayo observado en los estándares bajo, medio y alto empleados en cada experimento.

Análisis de derivados de óxido nítrico. Los productos finales del metabolismo del ON son los nitritos. Para cuantificar la concentración de nitritos, se colocaron 150 µl del estándar conocido o muestra a analizar (LP o SP), en una placa de 96 pozos. Posteriormente se agregaron 20 µL por pozo del reactivo de Griess (que convierte el nitrito en un compuesto morado intenso) más 130 µL de agua desionizada en cada pozo. La caja se cubrió de la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, leyéndose posteriormente la absorbancia a 492 nanómetros (nm) de longitud de onda, de los estándares y muestras desconocidas. La concentración de nitritos se determinó en las muestras de interés, mediante la interpolación de la absorbancia obtenida en la recta de calibración, tipo de estándares y absorbancia realizada.

FIGURA 1



Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3+/CD4+) productores de IFN- γ , en el grupo de mujeres fértiles ($n = 15$) y con endometriosis ($n = 25$). * $p < 0.05$ con respecto al mismo comportamiento del grupo testigo (t de Student; 95% confianza).

Análisis estadístico. Las variables independientes del grupo problema (mujeres estériles con endometriosis) se compararon con el grupo de mujeres sanas fértiles sin endometriosis, mediante prueba t de Student o análisis de varianza (ANOVA), con intervalos de confianza del 95 % para distribución normal de las variables. En caso contrario, la evaluación entre grupos se hizo mediante la prueba no paramétrica de U de Mann Witney, o ANOVA de Kruskal-Wallis. Se consideró significado estadístico con una $p < 0.05$.

Resultados

Análisis de citocinas intracelulares en linfocitos. Para conocer el tipo de respuesta inmunológica imperante en las subpoblaciones de linfocitos más importantes en cuanto a regulación de la respuesta inmunológica, los linfocitos T cooperadores (CD3+ /CD4+) y T citotóxicos (CD3+ /CD8+), se tiñeron intracelularmente con anticuerpos marcados con fluorocromos específicos anti IFN- γ y anti IL-2, como citocinas asociadas a una respuesta inmunológica citotóxica o Th1.

Los resultados mostraron que el porcentaje de linfocitos T cooperadores CD3+ /CD4+ que sintetizan IFN- γ , es menor en el grupo de mujeres con endometriosis, con respecto a las células provenientes del grupo de mujeres sanas, tanto en LP como en SP ($p < 0.05$, t de Student), al comparar a las mujeres con endometriosis en un mismo grupo (figura 1). Asimismo, el porcentaje de linfocitos T citotóxicos que sintetizan IFN- γ , mostró el mismo patrón de menor síntesis de la citocina ($p < 0.05$, t de Student), en las mujeres con endometriosis (figura 2). La misma citocina es el doble en el grupo testigo con respecto al grupo de estudio, para ambos compartimentos.

El análisis de síntesis de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, mostró un patrón similar al observado para la producción de IFN- γ , ya que el porcentaje de linfocitos que sintetizan IL-2, en LP y SP de las mujeres con endometriosis, es estadísticamente menor ($p < 0.05$; t de Student) en comparación con el valor obtenido en las mujeres fértiles (figura 3).

Para el caso de linfocitos T citotóxicos, los resultados obtenidos repitieron el patrón de menor producción de IL-2 ($p < 0.05$; t de Student) en células obtenidas de SP y LP de las mujeres con endometriosis, en comparación con mujeres fértiles (figura 4).

Con la intención de observar si la intensidad de la endometriosis tenía algún efecto sobre la capacidad de producción de las citocinas IFN- γ e IL-2, el grupo de mujeres con endometriosis se estratificó en estadios de

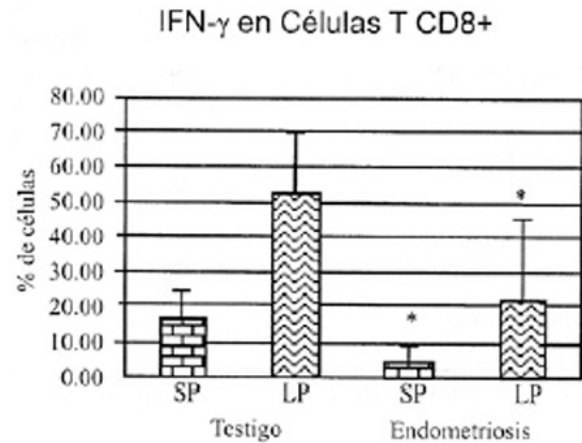
la enfermedad (I a IV), y se comparó con el grupo de mujeres fértiles.

Cuando se analizó en LP por grados de endometriosis, el porcentaje de linfocitos T cooperadores ($CD3+/CD4+$) que sintetizan $IFN-\gamma$ (Cuadro II) se observó que las células productoras de esta citocina tienden a aumentar en el grado II con respecto al grado I, seguida de disminución estadística significativa en el grado III ($p < 0.05$ con respecto al grado II) y finalmente se observa abatimiento casi total en el estadio IV ($p < 0.05$ con respecto al grado II). Además, la comparación de los estadios I, III y IV, con respecto al valor de mujeres fértiles, muestra disminución estadística significativa ($p < 0.05$; ANOVA).

Para el caso de linfocitos T citotóxicos ($CD3+/CD8+$) productores de $IFN-\gamma$, obtenidos del ambiente peritoneal (Cuadro II), se observa el mismo patrón de los linfocitos T cooperadores, pues hay una tendencia a aumentar de grado I a II; posteriormente disminuye de grado II a III ($p < 0.05$, con respecto al grado II) y en el grado IV se abate el porcentaje de células ($p < 0.05$ con respecto al grado II). También el porcentaje de estas células en los grados I, III y IV es menor que en el grupo testigo ($p < 0.05$).

Al aplicar el análisis antes descrito en las subpoblaciones celulares, obtenidas del ambiente periférico, se observó que los linfocitos T cooperadores productores

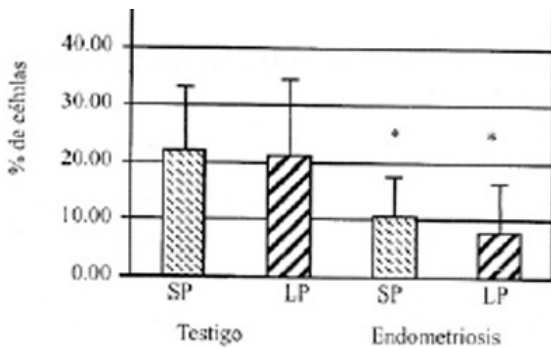
FIGURA 2



Porcentaje de linfocitos T citotóxicos ($CD3+/CD8+$) productores de $IFN-\gamma$ en el grupo de mujeres fértiles ($n = 15$) y con endometriosis ($n = 25$). * $p < 0.05$ con respecto al mismo comportamiento del grupo testigo (t de Student; 95% de confianza).

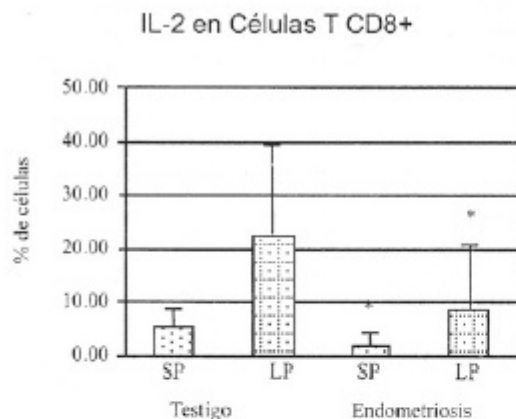
de $IFN-\gamma$ se encuentran disminuidos en los grados I, II y IV al compararlos con el grupo testigo ($p < 0.05$). Se observó una tendencia al aumento entre el estadio II y

FIGURA 3



Porcentaje de linfocitos T cooperadores ($CD3+/CD4+$) productores de IL-2, en el grupo de mujeres fértiles ($n = 15$) y con endometriosis ($n = 25$). * $p < 0.05$ con respecto al mismo comportamiento del grupo testigo (t de Student; 95% de confianza).

FIGURA 4



Porcentaje de linfocitos T cooperadores ($CD3+/CD4+$) productores de IL-2, en el grupo de mujeres fértiles ($n = 15$) y con endometriosis ($n = 25$). * $p < 0.05$ con respecto al mismo comportamiento del grupo testigo (t de Student; 95% de confianza).

CUADRO II. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3+/CD4+) y citotóxicos (CD3/CD8+) productores de IFN- γ e IL-2, obtenidos de líquido peritoneal (LP), en los estadios de endometriosis y grupo testigo

Citocinas intracelulares (%)	Endometriosis				Testigo (n=15)
	I (n=10)	II (n=7)	III (n=5)	IV (n=3),	
IFN- γ en CD4+/CD3+, 13.06*	16.04 ± 10.71	1.77* ± 11.95	0.10* ± 0.55	25.52 ± 0.14	± 11.07
IFN- γ en CD8+/CD3+	24.05* ± 21.45	39.16 ± 28.26	6.80* ± 6.34	0.40* ± 0.14	52.62 ± 18.06
IL-2 en CD4+/CD3+	8.93* ± 8.20	12.54 ± 10.56	1.20* ± 0.90	1.50* ± 0.71	21.06 ± 13.62
IL-2 en CD8+/CD3+	7.80* ± 5.02	20.00 ± 20.41	2.67* ± 2.51	0.10 ± 0.14	23.12 ± 16.72

* $p < 0.05$ con respecto al grupo testigo. (t de Student; 95% de confianza).

III, disminuyendo casi hasta el abatimiento en el estadio IV de la enfermedad (Cuadro III).

El porcentaje de linfocitos T citotóxicos productores de IFN- γ en SP, tiende a aumentar entre el grado I y II, después disminuye en el grado III, y entre el grado III y IV se abate casi totalmente la producción de la citocina, observándose diferencia significativa estadística ($p < 0.05$) en todos los casos antes referidos (Cuadro III).

Para el caso de los linfocitos T cooperadores que producen IL-2 en SP (Cuadro III), estos tienden a aumentar en los grados III y IV de la enfermedad; sin embargo, en los grados I y II hay una diferencia significativa con respecto al grupo testigo ($p < 0.05$). Los linfocitos T CD8+ que sintetizan la misma citocina tienden a aumentar conforme avanzan los grados de la enfermedad, y en los grados I y II el porcentaje de cé-

lulas es menor que en el grupo testigo ($p < 0.05$).

Determinación de citocinas solubles. Con el fin de describir el patrón de respuesta inmunológica Th1 o Th2 en el ambiente peritoneal, se cuantificaron cuatro citocinas en forma soluble mediante la técnica de ELISA. Como representantes de una respuesta tipo Th1 se cuantificaron IFN- γ e IL-2, y para respuesta tipo Th2 se determinaron IL-4 e IL-10.

Los resultados obtenidos de las citocinas (pg/mL) se corrigieron en cada caso por la concentración de proteína presente en el líquido peritoneal o plasma sanguíneo, determinando la cantidad de proteína por el método de Bradford.

La concentración de IFN- γ en el líquido peritoneal no mostró diferencia entre las mujeres con endometriosis (6.2 $\pm$ 3.9 pg/mg de proteína) y fértiles (9.3 $\pm$ 4.5 pg/mg de proteína). Sin embargo, al comparar

CUADRO III. Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3+/CD4+) y citotóxicos (CD3/CD8+) que sintetizan IFN- γ e IL-2, en sangre periférica (SP), en los cuatro estadios de endometriosis y en el grupo testigo

Citocinas intracelulares	Endometriosis				Testigo (n=15)
	I	II	III	IV	
IFN- γ en CD4+/CD3+	8.8* ± 5.61	5.64* ± 4.35	10.63 ± 5.30	1.15* ± 0.21	18.20 ± 8.52
IFN- γ en CD8+/CD3+	4.70* ± 3.53	7.92 ± 7.35	6.23* ± 1.27	1.20* ± 0.28	16.94 ± 8.48
IL-2 en CD4+/CD3+	11.33* ± 7.69	5.5* ± 7.24	14.10 ± 7.09	12.00 ± 1.41	21.76 ± 11.11
IL-2 en CD8+/CD3+	1.39* ± 1.12	1.68* ± 2.66	2.7 ± 0.44	6.85 ± 1.20	5.44 ± 3.64

* $p < 0.05$ con respecto al grupo testigo (t de Student; 95% de confianza).

CUADRO IV. CONCENTRACIÓN DE IFN- γ , IL-2, IL-4 E IL-10 EN LÍQUIDO PERITONEAL (LP), EN LOS CUATRO ESTADIOS DE ENDOMETRIOSIS Y EN EL GRUPO TESTIGO

Citocinas pg/mg de proteína	Endometriosis				Fértiles	
	I (n=12)	II (n=8)	III (n=6)	IV (n=4)	I a IV (n=30)	(n=15)
IFN- γ	69 ± 1.9	5.9 ± 4.2	7.4 ± 5.9	3.6* ± 2.2	6.2 ± 3.9	9.3 ± 4.5
IL-2	6.2	2.5 ¹	1.2 ¹	2.1 ¹	3.5	14.62
IL-4	9.38 ± 5.7	16.5 ± 11.5	11.9 ± 8.4	9.7 ± 6.5	11.9 ± 8.4	15.8 ± 8.1
IL-10	71.1 ± 56.1	32.2 ± 39.9	79.2 ± 117.4	17.49 ± 194.4	68.2 ± 92.4	79.6 ± 47.2

* $p < 0.05$ versus grupo testigo (*t* de Student; 95% de confianza). ($p < 0.05$ versus grupo testigo (ANOVA de Kruskal-Wallis, 95% de confianza).

por estadios de la enfermedad, se observó diferencia estadística ($p < 0.05$; *t* de Student) en el estadio IV con respecto al grupo testigo (Cuadro IV).

La concentración de IL-2 mostró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$; ANOVA de Kruskal-Wallis) al comparar el valor de las mujeres con endometriosis en un grupo, y entre los estadios II, III y IV en comparación con las mujeres fértiles (Cuadro IV).

Para el caso de la IL-4 no se observó diferencia estadística, al comparar los valores de las mujeres con endometriosis y fértiles, en forma estratificada y en grupo. Asimismo, la concentración de IL-10, no mostró diferencia estadística al comparar los valores de las mujeres con endometriosis y fértiles, en forma estrati-

ficada y en grupo (Cuadro IV). El análisis de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en el compartimiento periférico de las mujeres con endometriosis y sanas fértiles, no mostró diferencia estadística significativa alguna, al comparar los valores obtenidos por estadios de la enfermedad o en grupo (Cuadro V).

Subpoblación de linfocitos en líquido el peritoneal. El análisis de subpoblaciones de linfocitos en las mujeres fértiles y con endometriosis mostró diferencias estadísticas significativas entre el compartimiento periférico y peritoneal. Se observó disminución de linfocitos T cooperadores (CD3 + /CD4 +) en el LP con respecto a SP, asociada con aumento de linfocitos T citotóxicos (CD3 + /CD8 +) en LP con respecto a SP (Cuadro VI).

CUADRO V. Concentración de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en sangre periférica, de mujeres con endometriosis y sanas fértiles

Citocinas pg/mg de proteína	Endometriosis				Fértiles	
	I (n=12)	II (n=8)	III (n=6)	IV (n=4)	I a IV (n=30)	(n=10)
IFN- γ	19.6 ± 28.1	10.4 ± 12.1	33.6 ± 38.1	9.8 ± 6.9	18.5 ± 25.6	8.8 ± 3.9
IL-2	23.4 ± 16.8	7.4 ± 4.8	10.6 ± 3.1	8.2 ± 2.5	12.4 ± 7.4	14.62 ± 7.4
IL-4	67.4 ± 79.3	15.6 ± 7.2	102.7 ± 121.1	23.3 ± 5.5	56.4 ± 77.4	37.1 ± 27.9
IL-10	210.4 ± 172.1	131.5 ± 167.1	162.1 ± 55.7	134.6 ± 218.1	178.1 ± 155.2	175.3 ± 179.5

CUADRO VI. Subpoblaciones celulares cuantificadas por medio de citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células SP y LP

Subpoblación celular	Testigo (n=15)		Endometriosis (n=25)	
	SP	LP	SP	LP
T cooperadores	57.00 ±6.37	30.38 ±7.38	57.7 ±9.74	31.12 ±11.65
T citotóxicos	40.36 ±6.41	68.48 ±7.07	31.76 ±7.97	55.31 ±18.46
Relación CD4+/CD8+	1.46 ±0.36	0.46 ±0.15	1.95 ±0.66	0.62 ±0.34
T activados	5.94 ±5.97	12.62 ±8.98	4.20 ±3.39	2.26* ±2.66
Células NK	14.94 ±2.82	12.98 ±5.71	19.26 ±6.67	6.52 ±5.03
Macrófagos	14.78 ±16.79	44.66 ±34.30	33.09 ±29.59	51.35 ±20.60

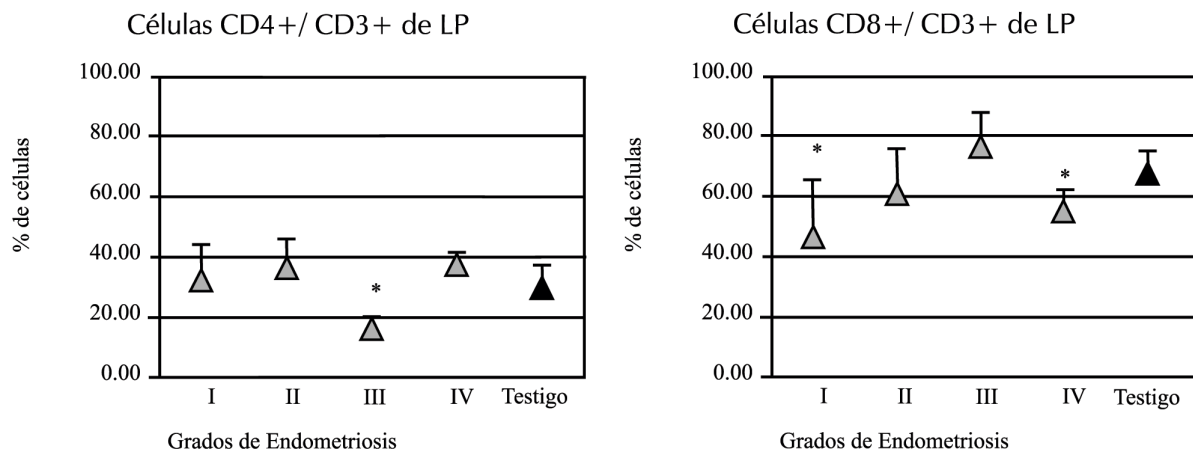
* $p < 0.05$ con respecto al mismo compartimiento del grupo testigo (t de Student; 95% de confianza). $p < 0.05$ con respecto al LP del mismo grupo (t de Student; 95% de confianza).

Se observó diferencia estadística en la población de linfocitos T citotóxicos, en el compartimiento periférico de las mujeres con y sin endometriosis.

Se observó menor porcentaje de linfocitos T activados (CD3+ /HLA-DR+), células NK (CD3-/CD16+ 56+) en el compartimiento peritoneal de las mujeres con endometriosis, en comparación con el valor de sangre periférica; característica no identificada en las mujeres fértiles (Cuadro VI). Asimismo, fue posible

observar menor concentración de linfocitos T activados y células NK estadísticamente significativas, en el compartimiento peritoneal de las mujeres con endometriosis, en comparación con el valor de mujeres fértiles (Cuadro VI).

Al analizar la subpoblación de linfocitos T cooperadores en las mujeres con endometriosis, estratificada por estadios de la enfermedad, fue posible observar menor porcentaje celular en el estadio III contra el va-

FIGURA 5

(a) Porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD3+/CD4+) de LP de mujeres con endometriosis y en el grupo testigo. (b) Porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) de LP de mujeres con endometriosis y en el grupo testigo. Estadios de la enfermedad: I (n = 10), II (n = 7), III (n = 5) y IV (n = 3). Grupo testigo (n = 15). * $p < 0.05$ con respecto al grupo testigo (t de Student; 95% de confianza).

lor de las mujeres fértiles (Figura 5a). Para el caso de los linfocitos T citotóxicos, analizados de la forma antes mencionada, fue posible observar diferencia estadística en los grados I y IV de la enfermedad contra el valor de las mujeres fértiles (figura 5b).

En el análisis de los linfocitos T activados, obtenidos de LP por estadios de la enfermedad, se observó menor porcentaje en los estadios I, III y IV contra el porcentaje celular obtenido en el mismo ambiente de las mujeres fértiles (figura 6a). Asimismo, el análisis realizado en la forma antes descrita para las células NK mostró menor concentración de estas células en los estadios I, III y IV de la enfermedad en comparación con los valores obtenidos de las mujeres fértiles (figura 6b).

El análisis de las poblaciones celulares en SP de las mujeres con endometriosis mostró menor concentración, estadísticamente significativa, de linfocitos T cooperadores en el estadio III; de linfocitos T citotóxicos en el estadio IV; de células NK en el estadio III de la enfermedad contra los valores correspondientes de las mujeres sanas fértiles (Cuadro VII).

Determinación de nitritos. Con la intención de identificar la presencia de óxido nítrico en LP y SP de los grupos de estudio, se determinó la existencia de nitritos en ambos fluidos, como molécula derivada del óxido nítrico, mediante la técnica de Griess. Se comparó el grupo de mujeres sanas fértiles ($n = 15$), con el grupo de mujeres con endometriosis ($n = 30$). El análisis realizado entre las mujeres fértiles y las que padecían endometriosis, no

mostró diferencia estadística alguna, al analizar las que tenían la afección en un solo grupo.

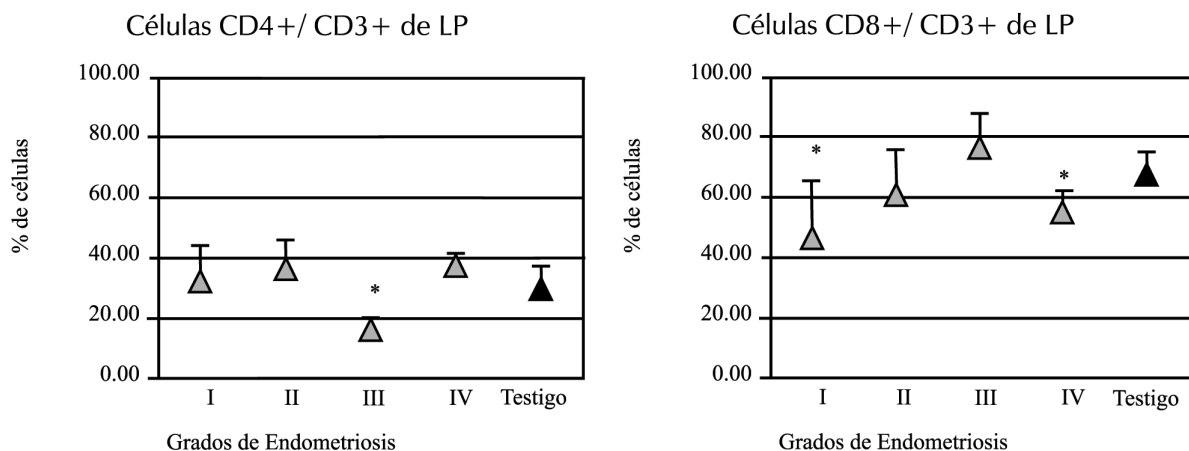
Al separar por grados de la enfermedad la concentración de nitritos y compararlos con el valor de las mujeres fértiles, se observó que en el líquido peritoneal hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$; Mann-Whitney Rank Sum) entre el estadio IV de la enfermedad y el grupo testigo (Cuadro VIII).

Asimismo, el análisis realizado de la concentración de nitritos presentes en SP, entre las mujeres fértiles y las mujeres con la enfermedad en un grupo, no mostró diferencia estadística alguna. Sin embargo, cuando se analizó por estadios de la enfermedad, se observó que la concentración de nitritos fue mayor que en el grupo testigo ($p < 0.05$; Mann-Whitney Rank Sum) en los estadios II y IV.

Discusión

La endometriosis representa el problema más importante asociado con la esterilidad, del cual aún se desconoce su causa. Las pruebas señalan que el sistema inmunológico tiene que ver con la supervivencia e implantación de las células endometriales fuera de la cavidad uterina, ya que se reporta abatimiento en la capacidad efectora citotóxica, por parte de células inmunológicas periféricas y peritoneales; aunque a la fecha no está establecido con claridad, el tipo de alteración inmunológica en estas mujeres.

FIGURA 6



(a) Porcentaje de linfocitos T activados (CD3+/HLA-DR+) de LP de mujeres con endometriosis, en comparación con el grupo testigo. (b) Porcentaje de linfocitos NK (CD3-/CD16+ CD56+) de LP de mujeres con endometriosis y en el grupo testigo. Estadios de la enfermedad: I ($n = 10$), II ($n = 7$), III ($n = 5$) y IV ($n = 3$). Grupo testigo ($n = 15$). * $p < 0,05$ con respecto al grupo testigo (t Student; 95% confianza).

CUADRO VII. Porcentaje de diversas subpoblaciones celulares de mujeres con endometriosis, en SP, en los cuatro estadios de la enfermedad y en el grupo testigo

Subpoblación celular	Endometriosis				Testigo (n=5)
	I (n=10)	II (n=5)	III (n=3)	IV (n=2)	
CD4+/CD3+	59.15 ±11.61	59.78 ±3.61	48.30* ±5.10	59.30 ±13.15	57.00 ±6.37
CD8+/CD3+	27.91* ±5.81	35.52 ±3.45	41.67 ±11.93	26.75* ±2.47	40.36 ±6.41
CD3+HLA-DR+	3.09 ±4.08	6.28 ±1.87	5.53 ±3.01	2.50 ±0.99	5.94 ±5.97
CD3-CD16+56+	15.77 ±7.35	20.38 ±6.56	24.55* ±4.03	22.25 ±3.18	14.94 ±2.82
CD45+14+	25.64 ±27.73	36.03 ±36.79	13.3 ±9.48	65.65* ±7.99	14.78 ±16.79

* $p < 0.05$ con respecto al grupo testigo (t Student; 95% confianza).

El presente trabajo abordó de manera integral el tipo de respuesta inmunológica coexistente en el ambiente periférico y peritoneal de mujeres con y sin endometriosis, determinando citocinas solubles e intracelularmente, así como subpoblaciones de linfocitos involucrados en la regulación de la respuesta inmunológica Th1 y Th2.

Las pruebas obtenidas en este trabajo en cuanto al porcentaje de linfocitos T cooperadores y citotóxicos, no señalaron diferencias en el LP entre el grupo testigo y el grupo de estudio, tomando en cuenta los cuatro grados de endometriosis en un mismo grupo; pero que al separar en estadios de la enfermedad se observó menor porcentaje en los estadios avanzados de la endometriosis. Se carece de explicación experimental al respecto; sin embargo, la existencia de un ambiente proinflamatorio en el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis promueve, en general, aumento en la expresión de diversas moléculas de adhesión, involucradas en la proliferación, señalización y apoptosis. El aumento en la expresión del ligando de Fas²⁸ en linfocitos T cooperadores y citotóxicos, podría inducir muerte celular y disminuir el número de ellos. El mis-

mo ambiente proinflamatorio puede inducir en las células endometriales la aparición de péptidos distintos, expresados en las moléculas clase I del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), que al hacer contacto con el TCR de los linfocitos T citotóxicos, induzca un efecto anérgico o apoptótico.²⁹

Cuando se determinó la capacidad de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos para sintetizar IFN- γ hubo una disminución importante en el porcentaje de estas células, en el ambiente periférico y peritoneal de mujeres con endometriosis, con respecto al grupo testigo, dato que correlaciona con los valores observados de menor número de células en los estadios avanzados de la enfermedad. Se observó disminución constante en el porcentaje de linfocitos T cooperadores y citotóxicos productores de IFN- γ , coexistentes en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis, en quienes los valores avanzados de la enfermedad, la cantidad de células capaces de producir IFN- γ es casi nula, lo que señala una incapacidad casi total para una respuesta citotóxica, ya que la presencia de esta molécula es indispensable para promover la diferenciación y activación celular hacia el brazo efector Th1.

CUADRO VIII. Concentración de nitritos en LP y SP de mujeres con endometriosis en los cuatro estadios de la enfermedad y en el grupo testigo

Nitritos mMol/mL	Endometriosis				Testigo (n=15)
	I (n=12)	II (n=8)	III (n=6)	IV (n=4)	
LP	8.71 ±2.70	11.76 ±4.54	11.09 ±4.94	15.68* ±3.16	9.32 ±3.00
SP	16.64 ±6.41	39.96* ±15.96	37.81 ±26.53	25.50* ±1.08	11.87 ±3.25

* $p < 0.05$ en comparación con el grupo testigo (Mann-Whitney Rank Sum; 95% de confianza).

Asimismo, el patrón de síntesis de IL-2, observado por linfocitos T cooperadores y T citotóxicos por grados de la enfermedad, fue igual al identificado en IFN- γ , ya que existe disminución constante en el número celular conforme avanza la enfermedad, hasta obtener valores casi nulos del porcentaje celular presente en los estadios avanzados de la enfermedad, lo que se suma a la incapacidad casi absoluta para que se monten respuestas del tipo Th1, pues la IL-2 también participa de manera importante en la dirección del brazo efector Th1.

Cuando se analiza la existencia de linfocitos T activados (HLA-DR) por estadios de la enfermedad, observamos que se abaten en los grados III y IV, lo que guarda relación con la síntesis de IFN- γ e IL-2, mostrada por las células T cooperadoras y citotóxicas, ya que se ha descrito la capacidad que expresan dichas citocinas para activar a los linfocitos T y promover la expresión de HLA-DR.^{30,31}

Como los linfocitos T no son las únicas células que sintetizan y liberan citocinas en el ambiente peritoneal, pareció conveniente conocer si la concentración de estas citocinas en forma soluble era diferente en comparación con el grupo testigo, y si variaba en los diferentes grados de la enfermedad. Los resultados encontrados concuerdan con los de citocinas intracelulares, ya que la concentración de IFN- γ e IL-2 solubles en LP del grupo de mujeres con endometriosis es menor que en el grupo testigo.

En el caso de la IL-2 se observa una tendencia a la disminución conforme avanzan los grados de la enfermedad, obteniéndose así una depleción significativa al final. Como ya se mencionó, estas citocinas son representativas de una respuesta tipo Th1, por lo cual podemos decir que esta respuesta se encuentra abatida en el LP de mujeres con endometriosis en el ámbito soluble y guarda estrecha relación con la producción observada en el ámbito celular, ya que IFN- γ y la IL-2 participan en la proliferación de células T y en la activación de células NK.

Se esperaba observar un aumento en las citocinas de tipo Th2, presuponiendo una contrarregulación por parte de estas citocinas al observar una disminución del IFN- γ y de la IL-2, pero no encontramos diferencia estadística alguna al analizar IL-4 e IL-10 por grupo o estratificando por estadios de la enfermedad. La interpretación de los patrones de estas citocinas indica que aunque no hay aumento en la respuesta tipo Th2, existe un desequilibrio debido a la disminución de las citocinas involucradas en la respuesta Th1.

Esta disminución en la respuesta Th1 guarda relación directa con las pruebas encontradas en la disminución de la capacidad lítica de las células NK (CD3-

CD16+/CD56+), en contra de las células endometriales de mujeres con endometriosis.^{10,32} Aunque algunos autores^{10,33} no han encontrado diferencias en endometriosis en la cantidad de células NK en comparación con mujeres sanas, nuestros resultados muestran que en el LP de mujeres con endometriosis está disminuida la cantidad de células con respecto al LP del grupo testigo. En los grados III y IV de la enfermedad se identifica una disminución abrupta del número de células NK, lo cual indica que hay relación con los datos de la actividad efectora,¹⁰ donde se señalan los estadios avanzados de la enfermedad con abatimiento de la actividad citotóxica por parte de estas células.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo señalan que el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis (porcentaje de células NK) es la mitad con respecto al grupo testigo, lo que representa una desventaja en términos de su capacidad para eliminar a las células endometriales con capacidad de implantarse ectópicamente, aunado a la baja estimulación que reciben dichas células para ejercer actividad citotóxica, al existir menor concentración de citocinas INF- γ e IL-2, citocinas de respuesta Th1.

Es posible que los macrófagos sean uno de los principales grupos de células encargadas de eliminar a los componentes celulares que llegan a la cavidad peritoneal.^{34,35} Nuestros datos mostraron que no hay diferencia con respecto al grupo testigo; sin embargo, la tendencia de estas células en el LP de mujeres con endometriosis es que disminuyan en los últimos grados de la enfermedad. Este resultado, sumando al menor número de células NK, en relación con la menor concentración de citocinas Th1, nos permite proponer la existencia de un abatimiento de la respuesta inmunológica de las mujeres con endometriosis, asociado con el desarrollo de la enfermedad.

Desconocemos las causas que condicionan tal característica, pero una de las moléculas que pensamos puede participar de manera importante es el óxido nítrico, ya que se ha descrito como un mecanismo que abate la respuesta Th1, y elimina la síntesis de INF- γ por parte de las células NK y los linfocitos T cooperadores.

Cuando los macrófagos se activan aumenta la generación de formas reactivas de nitrógeno, específicamente ON, siendo estas células las principales productoras de ON de estirpe inmunológica.³⁶ Está descrito que el ON inhibe la secreción de IL-2 e IFN- γ en células Th1, mientras que también se afirma que induce la producción de la citocina IL-4 del tipo Th2^{23,24} por lo que se asocia al ON, involucrado en los mecanismos de regulación inmunológica Th/Th2. También se ha mostrado que la vía iNOS puede mediar la citotoxicidad de

las células NK. Salvucci³⁷ demostró que el NO generado en las células NK en respuesta a la estimulación por citocinas, inhibe el potencial lítico de estas células, ya que al inactivar a la enzima productora de ON (iNOS) en dichas células, la actividad citotóxica se restaura, de aquí que la disminución de la actividad citotóxica de las células NK puede explicarse por la existencia de óxido nítrico.

Algunos estudios recientes³⁸ demuestran que la iNOS está distribuida a través del endometrio, identificándose cierta variación de su expresión durante el ciclo menstrual. Asimismo, se ha reportado que dicha enzima se expresa en exceso en el tejido endometrial eutópico de mujeres con endometriosis, durante el ciclo menstrual, desconociéndose los factores que promueven tal característica. Otros autores^{20,21} han encontrado que la estimulación crónica de macrófagos en la cavidad peritoneal, provoca la liberación constitutiva de grandes cantidades de productos de oxígeno reactivo en mujeres con endometriosis, lo que puede explicar la mayor concentración en forma constitutiva de óxido nítrico en las mujeres con la enfermedad.

Así, la disminución de las citocinas Th1 en forma soluble en el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis, se relaciona directamente con el patrón de disminución observado en la producción de citocinas Th1, por parte de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos, así como en el porcentaje de células NK. Quizá la disminución en el número celular y la concentración de citocinas Th1 afecte la capacidad citotóxica total del ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis, permitiendo a las células endometriales que llegan al peritoneo mayor supervivencia e, incluso, evasión de los mecanismos de eliminación, lo que podría conducir a la implantación ectópica del tejido.

Los resultados reportados en este trabajo ofrecen pruebas irrefutables que señalan una disminución en la capacidad efectora citotóxica en el ambiente peritoneal de las mujeres con endometriosis. Si bien se propone un mecanismo plausible para explicar dicha alteración, a través del óxido nítrico, es seguro que existen diversos factores asociados con el evento, por lo que es necesario abordar los mecanismos finos de regulación

inmunológica para conocer si los datos observados en el presente trabajo representan la causa o consecuencia de la endometriosis.

Conclusiones

1. Las mujeres con endometriosis muestran, en el ambiente peritoneal, disminución del porcentaje de linfocitos T cooperadores, T activados y de células NK, en los últimos grados de la enfermedad, con respecto al grupo de mujeres sanas fértiles.
2. Las mujeres con endometriosis sufren, en el ambiente peritoneal, menor porcentaje de linfocitos T cooperadores y T citotóxicos que sintetizan IFN- γ e IL-2, con respecto al grupo de mujeres sanas fértiles.
3. En el ambiente peritoneal de los estadios más avanzados de la enfermedad se abate, casi en su totalidad, el porcentaje linfocitos T cooperadores y citotóxicos que sintetizan IFN- γ e IL-2.
4. Las mujeres con endometriosis tienen, en el ambiente peritoneal, disminución de la concentración de IFN- γ en el estado más avanzado de la enfermedad, con respecto al mismo ambiente del grupo de mujeres sanas fértiles.
5. Las mujeres con endometriosis tienen, en el ambiente peritoneal, disminución de la concentración de IL-2, en los estados leve, moderado y severo, con respecto al mismo ambiente del grupo de mujeres sanas fértiles.
6. Las mujeres con endometriosis muestran, en el ambiente peritoneal, aumento de la concentración del derivado de óxido nítrico, en el estadio más avanzado de la enfermedad, con respecto al mismo ambiente del grupo de mujeres sanas fértiles.
7. El análisis de citocinas en el líquido peritoneal de linfocitos T cooperadores y citotóxicos, así como el porcentaje de células NK y linfocitos T activados, son indicio de abatimiento de la respuesta inmunológica citotóxica o Th1 en las mujeres con endometriosis. $\diamond$

Referencias

1. Schenken R, Burus W. Pathophysiology of endometriosis-associated infertility. En: Clinical obstetrics and gynecology. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1999;42:586-601.
2. Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997;24:219-33.
3. Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:859-62.
4. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984;64:151-4.
5. Braun DP, Gebel H, House R, Rana N, Dmowski NP. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65:1125-9.
6. Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE. Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67:1059-64.
7. Mazzeo D, Vigano P, Di Blasio AM, Sinigaglia F, Vignali M, Panina-Bordignon P. Interleukin-12 and its free p40 subunit regulate immune recognition of endometrial cells: potential role in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:911-6.
8. Hernández C, Vadillo F, Beltrán J, et al. Inducción de la síntesis de óxido nítrico en células mononucleares en cultivo utilizando líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, en relación al porcentaje de linfocitos T y células NK identificado en dicho ambiente. *Ginecol Obstet Mex* 2001;69:12-23.
9. Semino C, Semino A, Pietra G, Mangan MC, Barocci S, Venturini PL, et al. Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril* 1995;64:909-16.
10. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991;56:45-51.
11. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular*. España: McGraw-Hill Interamericana, 1995:274-305.
12. Umesaki N, Tanaka T, Miyama M, Mizuno K, Kawamura. Increased natural killer cells in patients treated with gonadotropin releasing hormone agonist. *Gynecol Obstet Inves* 1999;48:66-8.
13. Iwasaki K, Makino IK, Matsubayashi MT, Yokokura TA. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. *I J Fertil Menopausal Stud* 1993;38:229-34.
14. Opsahl MS, Clifford CH, Klein TH, Cunningham DS. Characterization of peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cell subsets in fertile and infertile women. *Obstet Gynecol* 1994;37:176-9.
15. Melioli G, Semino C, Semino A, Venturini P, Ragni N. Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1993;30:218-27.
16. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N. Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998;69:924-30.
17. Sillem M, Pifti S, Monga B, Arslan T, Runnebaum B. Integrin-mediated adhesion of uterine endometrial cells from endometriosis patients to extracellular matrix proteins is enhanced by tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin-1 (IL-1). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;87:123-7.
18. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 1998;70:425-31.
19. Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, Torry DS, Caudle MR. IL-1, TNF- γ , and IL-2 in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *AJRI* 1995;34:381-5.
20. Zeller JM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987;13:78-82.
21. Raiter-Tenenbaum A, Baranao RI, Etchepareborda JJ, Meresman GF, Rumi LS. Functional and phenotypic alterations in peritoneal macrophages from patients with early and advanced endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 1998;261:147-57.
22. Van der Veen RC, Dietlin TA, Dixon Gray J, Gilmore W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol* 2000;199:43-9.
23. Van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1491-500.
24. Chang RH, Feng MH, Liu WH, Lai MZ. Nitric oxide increased interleukin-4 expression in T lymphocytes. *Immunology* 1997; 90: 364-9.
25. Mosmann T, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets; Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996;17:138-46.
26. Roitt Ivan. *Inmunología fundamentos*. 9ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000; pp:185-95, 287-8.
27. Rock JA. The revised American Fertility Society classification of endometriosis: reproducibility of scoring. *Fertil Steril* 1995; 63: 1108-10.
28. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunology J* 1994; 12:735-73.
29. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999;285:221-7.
30. Gourley TS, Chang CH. Cutting edge: the class II transactivator prevents activation induced cell death by inhibiting Fas ligand gene expression. *J Immunol* 2001;166:2917-21.
31. Salgado FJ, Lojo J, Fernández-Alonso CM, Vinuela J, Cordero OJ, Nogueira M. Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells. *Immunol Cell Biol* 2002;80:138-47.
32. Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y, Oguri H, Kusume T, Fukaya T. Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 2002;77:297-302.
33. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. *Fertil Steril* 1994;62:1086-8.
34. Rana N, Braun DP, House R, Gebel H, Rotman C, Dmowski WP. Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal ma-

- crophages in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 65: 925-30.
35. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, et al. Tumor necrosis factor- α promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing Interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85 (2): 824-9.
36. Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis- associated infertility. *Fertil Steril* 2002; 77: 46-51.
37. Salvucci O, Kolb JP, Dugas B, Dugas N, Chouaib S. The induction of nitric oxide by Interleukin- 12 and Tumor Necrosis Factor- α in human natural killer cells: Relationship with the regulation of lytic activity. *Blood* 1998;92:2093-102.
38. Portz DM, Elkins TE, White R, Warren J, Adadevoh S, Randolph J. Oxygen free radicals and pelvic adhesion formation: I. Blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model. *Int J Fertil* 1991;36:39-42.



Activación en el complejo de metaloproteinasas en la capacidad generativa folículo-embionaria

Dr. Gerardo Barroso,¹ Dra. Clara Corona de Lau,² Dr. Julio González,³ QFB Lorena Loera,² MVZ, Belén Aguilar,¹ MVZ, Yadira Rosado,¹ Dr. Humberto Reyes

Resumen

Objetivo. Evaluar el impacto del complejo de inhibición enzimática de metaloproteinasas [TIMP/(MMP-3/stromelisin-1)] en los procesos de foliculogénesis y su posterior desarrollo óvulo/embionario en ciclos estimulados. Tipo de estudio: Longitudinal prospectivo efectuado en un centro de investigación. **Material y métodos.** Se evaluaron 20 pacientes en ciclos de fertilización *in vitro* en quienes se determinaron las concentraciones de metaloproteinasas de matriz en los días 3 y 12 de la estimulación, así como en el líquido folicular al momento de la captura ovular. La determinación de [TIMP/(MMP-3/stromelisin-1)] se realizó con métodos de inmunoensayo tipo ELISA y anticuerpos monoclonales. En la evaluación estadística se utilizaron modelos de regresión lineal (r/r^2) y pruebas de diferenciación por grupos, por el método de Kolmogorov-Smirnov, en la que los valores se expresaron según su media, desviación estándar y significado de $p < 0.05$. **Resultados.** Con el uso de modelos de regresión se encontró una correlación positiva entre las cifras basales de FSH y edad de la paciente [$(r^2 = 0.026)(p = 0.003)$]. Las pacientes se dividieron, para el estudio, en grupos de mayores y menores de 35 años de edad; se observó diferencia significativa en la concentración de metaloproteinasas en las concentraciones séricas (día 3 y 12 de estimulación) y en el líquido folicular. La disminución del 14% en la concentración del complejo [TIMP/(MMP-3/stromelisin-1)] se fue incrementando conforme más edad tenían las pacientes. **Conclusiones.** El estudio del complejo de metaloproteinasas de matriz ha permitido observar la situación no sólo en la calidad ovular sino también en los procesos de fertilización y desarrollo embionario. ◇

Palabras clave: Metaloproteinasas, capacidad folículo-embionaria, hormona folículo estimulante recombinante.

(Barroso G, et al. Activación en el complejo de metaloproteinasas en la capacidad generativa folículo-embionaria. Ginec Obst Mex 2003;71:575-584)

¹Unidad de Reproducción Asistida, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Clínica Lomas Altas. ²Laboratorio de Análisis Clínicos, Clínica Lomas Altas. ³Departamento de Ginecología y Obstetricia, Centro Médico ABC, México, DF.

Abstract

Objective. To evaluate the impact of the enzymatic inhibition complex of metaloproteinasas [TIMP/(MMP-3 stromelisin-1)] in follicle/genesis processes and their ovule/embryonic subsequent development in stimulated cycles. Type of study: Prospective longitudinal in research center. **Materials and methods.** A total of 20 patients were evaluated in vitro fertilization cycles measuring matrix metaloproteinasas concentrations in days 3 and 12 of ovarian stimulation, as well as in the follicular liquid at the moment of ovarian retrieval. The determination of [TIMP/(MMP-3 stromelisin-1)] was done by ELISA and monoclonal antibodies type of immunoassay methods. For its statistical evaluation were applied linear regression models (r/r^2) and Kolmogorov-Smirnov test comparing the two groups where values were expressed in agreement at its mean, standard deviation and a significance of $p < 0.05$. **Results.** For regression models was found a positive correlation between basal FSH and the age of patients [$r^2 = 0.26$]($p = 0.003$), dividing groups in older and younger patients than 35 years; it was observed significant difference in metaloproteinasas concentration as in serum concentration (days 3 and 12 of stimulation) as in the follicular liquid. A decrease in the 14% [(TIMP/(MMP-3/stromelisin-1)] complex concentration was increasing in accordance at the female patients age. **Conclusions.** The matrix metaloproteinasas complex study has allowed observing a status not only in the ovular quality but in the embryonic development and fertilization processes too. ♦

Key words: Metaloproteinasas, follicle-embryonic capability, recombinant follicle stimulant hormone. (Barroso G, et al. Activation in the metaloproteinasas complex in the follicle-embryonic generative capability. Ginec Obst Mex 2003;71:575-584)

Introducción

La adecuada interrelación entre las vías de activación y los procesos de biorregulación folicular para la formación de óvulos altamente competentes, es uno de los mecanismos básicos en ciclos expuestos a la respuesta endógena-exógena de gonadotropinas. La obtención de embriones de alta competitividad para proveer mejores posibilidades de concepción se ha convertido en uno de los objetivos principales en los programas de reproducción humana. El fenómeno de la concepción humana está determinado por la variación en diversos biomarcadores de la expresión óvulo-embrionaria, que permita una mejor selección y posibilidades de implantación mayor en mujeres objeto de este tipo de tecnología de alta complejidad.¹ La foliculogénesis ovárica está determinada por cambios endocrino-paracrinós que requieren la interacción dinámica entre la maduración ovular, la complementación por parte de las células de la granulosa, y la presencia de diversos factores dentro del líquido intrafolicular. El inicio del crecimiento folicular implica cambios fisiológicos, genéticos y metabólicos para complementar adecuadamente el proceso de meiosis, la prevención de polis-

permia, y el proceso inicial de embriogénesis después de la fertilización.

En los procesos de fertilización *in vitro* son necesarias la adecuada calidad y la adecuada cantidad folicular. El número reclutado de folículos en desarrollo depende, en forma proporcional e inherente, de la reserva ovárica relacionada no sólo con la edad cronológica de la paciente, sino con la concentración basal de FSH (hormona folículo estimulante), LH (hormona luteinizante), E_2 (estradiol) e inhibina-B séricos, así como de las características morfométricas del volumen ovárico. La calidad ovárica es una consecuencia directa de los procesos metabólicos y sincronización cromosómica que permiten la fertilización adecuada; además de la expresión génica en el desarrollo embrionario en forma temprana, así como su diferenciación. Cada uno de estos procesos está relacionado estrechamente con los fenómenos de atresia e inhibición en los mecanismos de muerte celular programada (apoptosis).

Cada embrión posee un potencial único de desarrollo, y sólo una pequeña y relativa proporción de ellos en el momento de la división celular es competente para la implantación después del proceso de fertilización en condiciones *in vitro*, y su desarrollo a través de la gesta-

ción.^{2,3} En el gameto femenino ocurren defectos letales en el desarrollo, antes de la inseminación. Los óvulos maduros pueden contener alteraciones cromosómicas de tipo numérico (aneuploidismo) y defectos estructurales en el citoplasma que de alguna manera predisponen a la fertilización ovular y su posterior falla en el desarrollo embrionario.^{3,4} El potencial de implantación embrionaria puede ser correlacionarse con el grado y etapa de división; sin embargo, el valor predictivo, en forma general, es relativamente bajo. El grado de fragmentación embrionaria u otros defectos morfológicos, así como el retardo en el desarrollo, pueden indicar en forma indirecta una incidencia mayor de anomalías cromosómicas.⁵

Todas estas anomalías pueden ser el resultado de alteraciones de las condiciones intrafoliculares durante la maduración ovular preovulatoria en la hiperestimulación ovárica controlada. La extensión por la que la detección de aneuploidismo en óvulos maduros se debe a defectos cromosómicos que suceden antes de la supresión, en el proceso final de meiosis, en estadios de maduración en profase I, sigue ignorándose.⁶ Es bien sabido que cuando las condiciones en los medios de cultivo no son óptimas, incluidos los medios de cultivo de baja calidad, pueden generar o favorecer los defectos preexistentes. Se ha tratado de demostrar la presencia de ciertos factores intrafoliculares secretados a la circulación general y que pudieran predecir el desarrollo y la competencia óvulo-embrionaria.

Factores de contrarregulación homeostática a nivel folicular

Los sistemas reguladores intrafoliculares están compuestos por una serie de sustancias, incluidos los factores de crecimiento, citocinas, neuropéptidos y moléculas vasorreguladoras. La homeostasia folicular permite el desarrollo de óvulos sanos, fertilizables con adecuada luteinización, lo cual dependerá en forma estricta de la relación entre los componentes de flujo vascular y las moléculas reguladoras.

En numerosos análisis bioquímicos efectuados dentro del líquido folicular humano, en ciclos estimulados, se ha demostrado que las concentraciones de esteroides, hormonas gonadotrópicas, factores de crecimiento, enzimas, etc., difieren en forma significativa entre folículos en el momento en que se aspiran durante la captura ovular. La frecuencia de apoptosis en las células de la granulosa y los patrones de adhesión en las células del cumulus, con la consiguiente proliferación *in vitro*, son actividades que sugieren ser folículo-específicos y que se relacionan, respectivamente, con la com-

petencia en el desarrollo ovular y embrionario.^{7,8}

Los estudios referentes a la vascularidad perifolicular, relacionados con la disolución del contenido de oxígeno intrafolicular, sugieren la asociación entre las condiciones intrafoliculares *per se* y la competencia ovular. La valoración clínica en fertilización *in vitro*, con monitorización ovárica en ciclos estimulados con la aplicación de tecnología ultrasonográfica, provee imágenes estáticas en donde el diámetro folicular y los volúmenes aproximados del líquido folicular pueden medirse. Ésta, en conjunto con las concentraciones séricas de estradiol y la apreciación de los diámetros foliculares, se utiliza para determinar el tiempo en el cual se debe inducir la ovulación.

La aparente extensión del flujo vascular perifolicular se ha relacionado con el desarrollo ovular, a través de los embriones obtenidos en forma específica por cada folículo analizado.³ Los análisis citogenéticos de óvulos en estadio de metafase II han mostrado diferencias en la frecuencia de aneuploidismo; si los oocitos se obtuvieron adecuadamente (< 5%) o no (> 35%) de folículos vascularizados.³ El valor clínico en este tipo de estudios ultrasonográficos debe verificarse con las tasas de embarazo siguientes. Lo que es un hecho es que los óvulos con organización anormal citoplasmática, inclusiones atípicas, alteraciones cromosómicas de tipo numérico, así como la supresión en el desarrollo embrionario, parecen ser predominantes cuando estos derivan de folículos pobremente vascularizados.³

Componentes intrafoliculares

Los estudios recientes relacionados con la disolución del oxígeno y la composición de los factores de crecimiento, sugieren la existencia de una relación directa en la competencia ovular. La medición del contenido de oxígeno disuelto se realizó en más de 1,000 folículos aspirados, donde se midió el grado de vascularidad perifolicular con ultrasonografía Doppler en el día de la ovulación.⁶ Los resultados indicaron que la concentración de oxígeno disuelto en el líquido folicular se encontraba entre 1 y 5%. En condiciones de hipoxia severa las concentraciones fueron de < 1.5% comparado con > 3.5% en folículos bien vascularizados.

La expansión en la vascularidad perifolicular parece estar relacionada con la producción de factores de crecimiento por parte de las células de la teca y la granulosa. El factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) es un potente factor angiogénico que reacciona ante la presencia de FSH, LH y hCG; así como en condiciones establecidas de hipoxia. Aunque se han señalado concentraciones significativas

de este factor en el líquido folicular, su papel sigue dando lugar a la controversia. Se ha observado que el pobre desarrollo de la capilaridad perifolicular en mujeres de edad avanzada puede estar relacionado con una expresión disminuida del FCVE, así como con otros factores concomitantes. La observación de que las concentraciones de FCVE en el líquido folicular de mujeres de edad avanzada (con folículos que tienden a ser menos vascularizados) son significativamente mayores, cuando se comparan con las de folículos con desarrollo completo y patrón de vascularidad mejor observado en mujeres jóvenes, resulta paradójico.

Otros factores que pueden modular la expresión folicular de FCVE se expresan en las células de la granulosa, para la función de esteroidogénesis,⁹ y pueden tener una expresión disminuida en mujeres de edad avanzada.

En la actualidad, la leptina se reconoce como promotora en la angiogénesis,¹⁰ y en un reporte reciente, se encontró tan efectiva como el FVCE en el proceso de angiogénesis en condiciones *in vitro*. La leptina y sus receptores se expresan en las células de la granulosa (quizá en el cumulus), donde parecen tener significado en la producción de esta proteína.¹¹ Así como en el caso del FVCE, la producción de leptina se relaciona con la biosíntesis de esteroides y el surgimiento de la LH.¹²

En un estudio multicéntrico y longitudinal tratamos de examinar la relación que existía entre el FVCE, el óxido nítrico y las concentraciones de leptina, con el flujo vascular endotelial, los índices metabólicos y el desarrollo óvulo-embrionario posterior. Se encontró que todos pueden ser marcadores de hipoxia folicular y de desarrollo embrionario no óptimo, donde las fluctuaciones microambientales en cada uno se reflejan en el desarrollo ovular.

El entendimiento completo de la relación entre la competencia ovular, la vascularidad folicular y las concentraciones en los factores angiogénicos, no se ha determinado con precisión. Sin embargo, los hallazgos actuales demuestran que existen potentes factores de crecimiento vascular en el líquido folicular que dan soporte a la noción de que el desarrollo vascular en los folículos preovulatorios podría tener un papel importante en la determinación de las condiciones ambientales "normales" en las que el ovocito está expuesto.

Mecanismo bioenzimático de metaloproteinasas de matriz (MMP)

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) pertenecen a una familia de enzimas responsables de la degradación

de componentes de matriz extracelular, como: colágena, laminina y proteoglicanos.¹³ La actividad de las metaloproteinasas de matriz que produce el efecto de remodelación, se controla mediante: a) producción y secreción de enzimas de tipo latente, b) activación de enzimas latentes y c) inhibición de la actividad enzimática por medio de inhibidores de MMP.¹⁴

Los inhibidores relacionados con MMP pueden clasificarse como: a) derivados titulares de soporte sérico y b) inhibidores de la actividad enzimática para MMP (TIMP). Los inhibidores de soporte sérico, como la α 2-macroglobulina, se localizan en diversos sitios del organismo humano. El papel principal de esta clase de inhibidores, en la regulación de la actividad de MMP en los tejidos ha sido cuestionado, sobre todo por sus dimensiones (> 720 kDa) y su capacidad para cruzar la membrana basal endotelial. La segunda clase de inhibidores de metaloproteinasas conocidos como inhibidores titulares de metaloproteinasas (TIMP), que son secretados en los tejidos y que se sugieren para el control en el sitio y extensión de la remodelación tisular por inducción-MMP. En la actualidad se conocen cuatro inhibidores titulares de metaloproteinasas relacionados con los procesos de angiogénesis, esteroidogénesis, proliferación celular y desarrollo glandular mamario (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4).¹⁵

Relación de la actividad de metaloproteinasas de matriz en los procesos reproductivos

Durante el curso del ciclo reproductivo se ha tratado de relacionar el efecto de la expresión de metaloproteinasas y el de los inhibidores enzimáticos, que va directamente a los procesos de expresión endometrial, desarrollo folicular, expresión esteroidogénica, complejo cúmulo-ovular, etc. La expresión de los inhibidores de metaloproteinasas dentro del útero y su papel específico permanecen aún desconocidos, prácticamente en todas las especies animales. Antes se demostró que la disrupción génica para la producción de TIMP-1 resulta en la alteración de los ciclos reproductivos en un fenotipo útero-aberrante. Estas características fenotípicas pueden estar dadas por el incremento de la actividad *in utero* de las metaloproteinasas de matriz. Así, el incremento en la actividad y concentración de proteasas se ha descrito en forma secundaria a la disrupción en la expresión de TIMP-1.¹⁶

El estudio de la relación del potencial colangeolítico y la transcripción ARNm en los componentes de degradación de matriz extracelular, se ha expuesto en modelos bovinos de estudio. La expresión de diversos factores (factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF),

factor beta 1 de crecimiento de transformación [(TGF- β)] se ha cuantificado *in vitro* en el complejo cúmulo-ovular (COC) en condiciones de maduración. Estos estudios sugieren incremento *in vitro* en los procesos de proteólisis extracelular en condiciones de maduración, en los complejos COC en bovinos; relacionados directamente con este tipo de factores de crecimiento.¹⁷

Son pocos los estudios relacionados con los episodios de maduración y remodelación ovular. Sin embargo, se ha sugerido la expresión proteolítica de las metaloproteinasas de matriz (MMO-1, MMP-3) en los episodios de remodelación a través del ciclo ovárico. Con la aplicación de ensayos de inmunoabsorbencia (ELISA) se ha podido demostrar la disminución de la actividad de MMP-1, dentro de la región apical de la pared de folículos atrésicos. Así mismo, se encontró una correlación negativa entre la concentración de MMP-3 y el diámetro folicular.¹⁸ Estos datos sugieren un papel preponderante en la actividad de las metaloproteinasas en la fase final de los procesos de atresia.

El objetivo de este trabajo es demostrar el impacto en la expresión del complejo de inhibición enzimática de metaloproteinasas (TIMP-1) y la concentración de metaloproteinasas de matriz [MMP-3/(estromelisin)] en los procesos de foliculogénesis y el posterior desarrollo óvulo-embrionario luego de la administración exógena de gonadotropinas recombinantes. Los datos que a continuación se describen son una base preliminar de un proyecto de diseño longitudinal y prospectivo.

Material y métodos

Selección y evaluación en ciclos de hiperestimulación controlada

Se incluyeron 20 pacientes en forma prospectiva a un estudio de tipo longitudinal, mismo que se efectuó entre enero y marzo del 2003. Los rangos de edad se encontraron entre 23 y 41 años con una media de 33.9 ± 5.0 . Se incluyeron al protocolo de estudio las pacientes con indicación para procedimiento de fertilización *in vitro*, así como técnicas de micromanipulación, como la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). En el caso del factor masculino se realizaron pruebas de capacitación espermática con técnica de swim-up y aplicación del criterio estricto de Tygerberg¹⁹ para la aplicación de cada una de las técnicas de alta complejidad.

Las pacientes con FSH ≥ 15 mUI/mL por estudio de quimioluminiscencia (predictivo de pobre respuesta ovárica) se excluyeron del análisis, al igual que las pacientes con una relación LH/FSH de 0.85:1 o mayor

[ovario poliquístico (PCO)], y las que tenían hipogonadismo hipogonadotrópico.

Todas las pacientes fueron suprimidas con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH) [Lucrin®] siguiendo el protocolo de fase lútea media. La GnRH se inició en la fase lútea media, antes del ciclo estimulado a una dosis de 0.5 mg/día y reducido a 0.25 mg/día al inicio del primer día del ciclo menstrual, mismo que se continuaría hasta la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) —protocolo largo de aGnRH—. FSH recombinante (Gonal-F®). Se administró el día tres del ciclo menstrual con dos ampulas (150 UI/ampula), en donde la dosis se ajustó en forma individual, siguiendo el protocolo de step-down. Cuando se observó un mínimo de tres folículos ≥ 18 mm a través del ultrasonido, se administraron 250 mcg s.c. de hCG. Los ciclos se cancelaron cuando se reclutaron menos de tres folículos al día 9 del ciclo o si el pico de estradiol se incrementaba en forma inapropiada. La aspiración folicular se realizó 34 a 36 horas posteriores a la administración de hCG.

Cada ovario se midió en sus ejes axial y longitudinal en tiempo real con un transductor de 6.5 MHz (General Electric, Logic® 200, Tv).

Sólo se analizó el resultado de ovocitos preovulatorios maduros (metafase I y II durante el tiempo de aspiración). Se evaluaron los ovocitos obtenidos en forma independiente, por aspiración ovular, para correlacionarlos directamente con su desarrollo posterior embrionario y las concentraciones de TIMP-1/MMP-3.

El proceso de inseminación dentro del laboratorio se llevó a cabo dependiendo de la indicación establecida para cada caso (estándar o a través de fertilización asistida con inyección intracitoplasmática de espermatozoide o ICSI).

El desarrollo embrionario se realizó con medios de cultivo (P1) hasta obtener de seis a ocho células, previo a la transferencia embrionaria. Se transfirieron, en promedio, a la cavidad uterina de tres a cuatro embriones, dependiendo de la calidad embrionaria y edad de la paciente. Todas las pacientes recibieron suplemento de fase lútea con progesterona intravaginal a la dosis de 600 mg/día.

Ensayo para determinación de metaloproteinasas MMP-3/TIMP-1

La determinación de MMP-3/TIMP-1 se realizó con inmunoensayos enzimáticos (ELISA) y aplicación de anticuerpos monoclonales. Las muestras recolectadas se centrifugaron (séricas y de líquido folicular) a 400 g X 15 mm y conservaron en refrigeración a -20°C.

Para la evaluación del ensayo se tomaron 100 μ L de

la muestra, que se colocaron dentro de cada pozo. A cada pozo se le colocó una lámina y se cubrieron para su incubación a temperatura ambiente por las siguientes dos horas, sin que éstas fueran agitadas. Las muestras se tomaron y lavaron en cuatro ocasiones con solución Buffer IX, procurando mantener a su límite cada uno de los pozos.

Cada uno de los pozos se lavó con 400 µL de solución Buffer IX utilizando pipetas multicanal. La solución Buffer se removió completamente después de utilizarse.

En cada pozo se colocaron 100 µL del conjugado MMP-3 que luego se cubrieron con una membrana laminar y se sellaron para mantenerlos a temperatura ambiente durante una hora. Enseguida de la incubación, se aspiró el reagente y se lavó en cuatro ocasiones con la misma solución Buffer. Se colocaron nuevamente 100 µL de tetrametilbenzidine (TMB). El reagente fue cerrado e incubado durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Enseguida se agregaron 100 µL de la solución de detención (2.5 N de ácido sulfúrico), dentro de cada pozo en el mismo orden como fue agregado previamente el TMB. Se obtuvieron las medidas de absorbancia bajo lecturas espectrofotométricas con bivalencia de lecturas 450/595 nm.

Evaluación estadística

Por el tipo de distribución Gaussiana, se utilizaron pruebas de distribución paramétrica tipo Welch. Los intervalos de confianza al 95 % se expresaron para cada uno de los grupos de estudio. Se utilizaron pruebas de significado con la aplicación del método de Kolmogorov-Smirnov para evaluar diferencias entre cada uno de los grupos, con base en la discrepancia entre la distribución de la población (en este ca-

so heterogénea) y el número de datos incluidos en el estudio. Por diseño de estudio se evaluó la tasa de crecimiento relacionado con la determinación de TIMP/MMP en diversos tiempos de evaluación.

Para la obtención de coeficientes de correlación (r/r^2) entre grupos de estudio, grados de libertad y suma de cuadrados, se aplicaron modelos de regresión lineal, que se determinaron de la misma manera. Todos los valores obtenidos se expresaron como media, desviación estándar, y error estándar, expresando significado como $p < 0.05$.

Resultados

La edad promedio de las pacientes fue de 33.9 ± 5.0 años con un rango entre 23 y 41 años de edad. La estatura y talla se correlacionaron directamente con el índice de masa corporal (IMC) con una media de 23.4 ± 3.19 , lo que implica que la mayoría de las pacientes no eran obesas, lo cual podría tener alguna implicación en la cantidad de FSH recombinante administrada. La evaluación por diseño de estudio de la reserva ovárica fue similar para cada uno de los casos. (Cuadro I)

Por modelos de regresión lineal se encontró una correlación positiva entre las basales en día 3 de FSH y la edad de la paciente [$r^2 = 0.26$] ($p = 0.03$) (Figura 1).

La relativa baja dosis promedio de medicamento se relaciona con las características demográficas de la población en estudio. La tasa promedio de óvulos maduros en metafase II (M_2) fue de 10.78 ± 6.8 óvulos, el número de óvulos fertilizados en dos pronúcleos fue de 5.21 ± 3.1 , transfiriéndose un promedio de 3.21 ± 1.0 embriones. (Cuadro II)

De acuerdo con la respuesta folicular, los grupos se separaron según su la edad; el grupo I (< 35 años) y grupo II (> 35 años), en los cuales las características de distribución presentaron una media de 1.21 ± 1.30 para el primer grupo y 0.12 ± 0.12 para el segundo según se muestra en el cuadro III.

Se encontraron diferencias significativas al comparar la concentración del complejo TIMP-1/MMP-3 por grupos de edad, en donde las concentraciones fueron mucho mayores en pacientes menores de 35 años de edad, en comparación con el grupo alterno ($p = 0.05$) (cuadro IV).

Se correlacionó, aunque no significativamente, la concentración de metaloproteinasas y las basales de reserva folicular evaluadas a partir de la concentración sérica de FSH el día tres del ciclo no-estimulado ($r^2 = 0.14$) (Figura 2).

Del mismo modo, la obtención de óvulos maduros

CUADRO I. Características demográficas y de reserva folicular en el grupo de estudio

Variable	Valor de incidencia
Edad	33.90 ± 5.00
Peso	61.95 ± 7.90
Talla	1.63 ± 0.10
IMC	23.4 ± 3.19
FSH/D31 (mUI/mL)	5.79 ± 2.11
LH/D31 (mUI/mL)	4.38 ± 2.00
E2/D31 (mUI/mL)	43.08 ± 22.40

1D3: Basales séricos en día tres del ciclo estimulado

CUADRO II. Desarrollo foliculo/embrionario en la población general del estudio

Variable	Valor de incidencia
Número de ampollas	17.29 ± 5.23
Pico de estradiol (pg/mL)	3011 ± 1653
Día de hCG	11.72 ± 0.89
Número de óvulos en metafase II (M2)	10.78 ± 6.81
Número de óvulos en metafase I (M1)	1.67 ± 1.64
Número de óvulos en profase I (P1)	1.28 ± 1.52
Número de óvulos fertilizados (2PN)	5.21 ± 3.15
Número de embriones transferidos	3.21 ± 1.03
Tasa de embarazo clínico/transferencia	50%

CUADRO III. Distribución Gaussiana por grupos en el complejo del factor de inhibición/estromelisin-1

Parámetro	TIMP-I/IMMP-3 (< 35 años)	TIMP-I/MMP-3 (> 35 años)
Media	1.21	0.12
Desviación estándar	1.30	0.12
Error estándar	0.39	0.06
¹ IC 95% Inferior	0.33	-0.07
¹ IC 95% Superior	2.08	0.32

¹IC 95% Inferior: Intervalo de confianza inferior. ²IC 95% Superior: Intervalo de confianza superior

CUADRO IV. Evaluación diferencial en la concentración del complejo de metaloproteinasas por homogeneidad de grupos

Parámetro	TIMP-I/MMP-3 (< 35 años)	TIMP-I/MMP-3 (> 35 años)	p
Día 3/ ¹ C° (ng/mL)	2.55±2.34	1.36±0.81	0.05
Día 12/ ¹ C° (ng/mL)	1.26±1.42	0.23±0.19	0.05
² [Lf] (ng/mL)	0.83±0.86	0.43±0.40	0.05

C°: Ciclo estimulado

²[Lf]: Concentración en líquido folicular

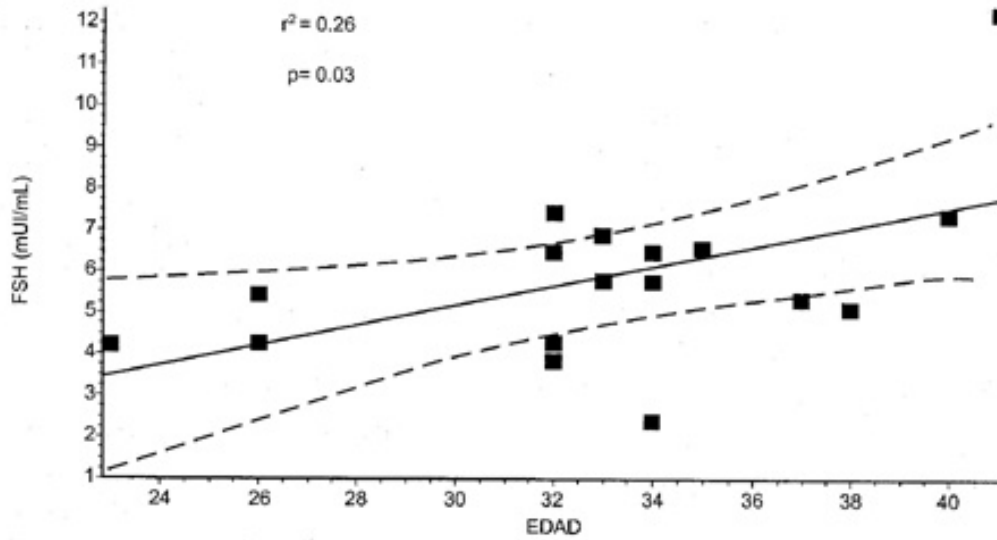
en estadio de metafase II se correlacionó negativamente con la concentración basal del complejo de metaloproteinasas, valorado en el tercer día de la estimulación ($r^2 = 0.67$) (Figura 3).

Discusión

Existen muchas pruebas de la actividad de los procesos regulados a partir de la concentración de moléculas de soporte y degradación regulada a través de metaloproteinasas y sus complejos de inhibición, no sólo en el área reproductiva, sino también en diversos procesos fisiopatológicos del organismo humano. Durante los procesos de ovulación, la matriz extracelular se degrada dentro del ápex folicular, facilitando la liberación del ovocito.²⁰ El líquido intrafolicular contiene, al me-

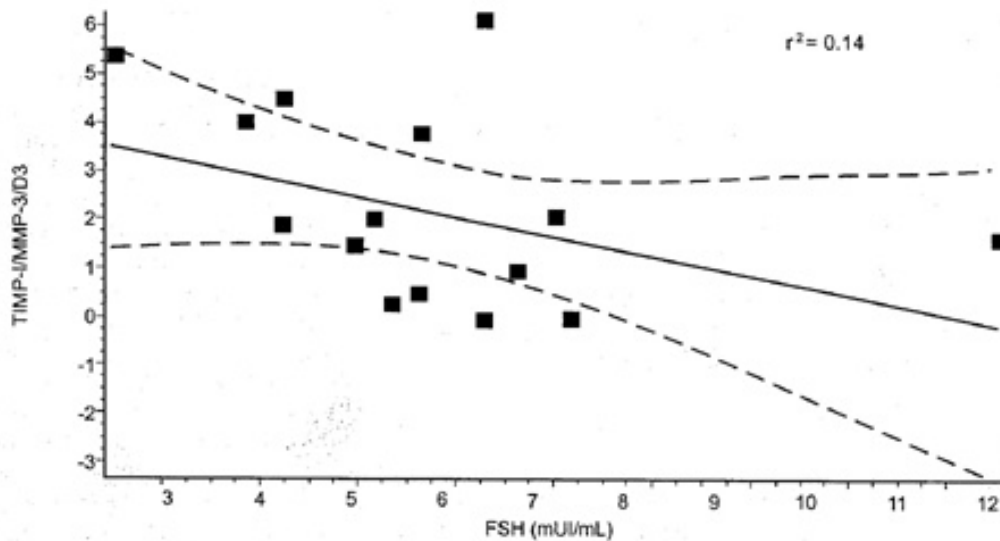
nos, dos tipos de inhibidores de proteinasas cuya actividad se correlaciona directamente con la actividad hormonal. Durante la fase periovulatoria y posterior al surgimiento de LH, el incremento de los fenómenos de esteroidogénesis se incrementa.²¹ El surgimiento del pico de LH o la administración de hCG incrementan del mismo modo la actividad de colágeno-metaloproteinasas, enzimas que se consideran responsables de la degradación apical de tejido conectivo de matriz.²² A pesar de que la estimulación en la actividad de la colagenasa, por parte de la LH, está bien documentada, el control posterior de la colagenólisis folicular sigue sin conocerse. En los estadios de maduración folicular también se ha observado aumento de la cantidad de inhibidores relacionados directamente con la concentración de estradiol y de progesterona.

FIGURA 1



Efecto de regresión entre la capacidad de función ovárica y edad

FIGURA 2

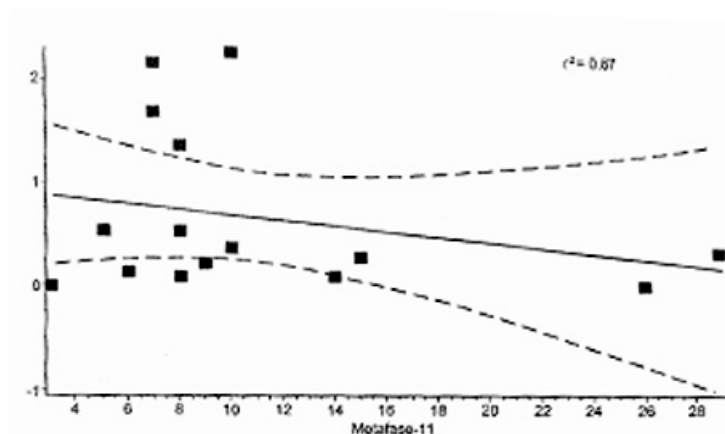


Relación lineal de la concentración del complejo de metaloproteinasas con la concentración basal de FSH.

El presente estudio señala la relación en la concentración del complejo de inhibición TIMP-1/MMP-3, en ciclos de estimulación ovárica controlada expuestos a

la administración exógena de gonadotropinas recombinantes. Los hallazgos iniciales fueron de disminución de las concentraciones a lo largo del ciclo estimulado,

FIGURA 3



Correlación entre la concentración de metaloproteinasas en líquido folicular y calidad ovular.

en donde puede estar directamente relacionado con las condiciones microambientales foliculares. Antes se demostró la disminución en las concentraciones de MMP-1 en los folículos atrésicos, lo cual es congruente con los hallazgos encontrados en este estudio. Además, existe una correlación negativa entre la cantidad de MMP-3 y el diámetro folicular.¹⁸

A pesar de observar diferencias ligeramente significativas en la población (quizá por la heterogeneidad y número limitado de datos para su evaluación) en cuanto a las concentraciones de los complejos TIMP-1/MMP-3, se hace evidente la disminución paulatina de estos a lo largo del ciclo menstrual. Cuando se comparan dos poblaciones diferentes por grupo de edad se encuentran diferencias muy significativas en donde las pacientes menores de 35 años de edad mantienen concentraciones séricas de metaloproteinasas mayores que las pacientes de mayor edad. El valor predictivo de estos resultados puede, eventualmente, mostrar una correlación de la calidad ovular asociada con los procesos de atresia folicular e interrelación con los procesos de muerte celular programada.

Bajo esta misma conformación de datos observa-

mos que la edad tiene un efecto irreversible en los procesos de estimulación, no sólo en la cuantificación folicular obtenida a través del ciclo estimulado, sino probablemente con la calidad ovocitaria relacionada con estos factores intrafoliculares. Uno de los objetivos establecidos durante el diseño de estudio fue evaluar la tasa de crecimiento en la concentración de TIMP-1/MMP-3 y relacionarlo directamente con la edad, a través de ciclo estimulado. Entre los hallazgos más importantes estuvo la observación de que la concentración de metaloproteinasas disminuye en 14 % por cada año que aumenta la edad de la paciente. La expresión de los complejos mencionados y su relación con los episodios de maduración y remodelación folicular permitirá explicar ciertos fenómenos relacionados con la dinámica biomolecular ovocitaria. La expresión de marcadores de respuesta intrafolicular también permitirá evaluar las condiciones de desarrollo óvulo-embionario, no sólo en ciclos naturales, sino también en los relacionados con la administración exógena de gonadotropinas en los procesos de tecnología reproductiva. ◇

Referencias

1. Gradner D, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997;3:367-82.
2. Acosta A, Oehninger S, Morshedi M, Swanson R, Scott R, Irianni F. Implantation potential of each pre-embryo in multiple pregnancies obtained by *in vitro* fertilization seems to be different. *Fertil Steril* 1988;50:906-11.
3. Van Blerkom J. Can the developmental competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory? *Hum Reprod* 1997;12:1610-14.
4. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997;12:1047-55.
5. Kligman I, Benavide C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996;11:1492-98.
6. Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:226-34.
7. Billing H, Furuta I, Hsueh A. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 2003;103:310-3.
8. Seifer D, Gardiner A, Ferreira K, Peluso J. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1996;66:593-8.
9. Anastasi J, Kalantaridou S, Kimsey L, et al. Human follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum Reprod* 1998;13:1144-7.
10. Boulomieu A, Drexler H, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of the Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998;83:1059-66.
11. Messinis I, Milingos S. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5:52-63.
12. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, Abuhamad A, Oehninger S. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil Steril* 1999;72:1024-6.
13. Borden P, Heller R. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gen Expression* 1997;7:159.
14. Birkedal-Hansen H, Moore W, Bodden M, Windsor L, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
15. Fridman R, Bird R, Hoyhtya M, Oelkelt M, Komarek D, Liang CM, Berman ML, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Fuerst T. Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J* 1993;289:411-6.
16. Warren B. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene in reproductive-age female mice is associated with estrous cycle stage-specific increases in stromelysin messenger RNA expression and activity. *Biol Reprod* 2001;65:1780-8.
17. Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R. Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during *in vitro* maturation of bovine cumuocyte complexes. *Biol Reprod* 1988;59:801-6.
18. Bogusiewicz M, Rechberger T, Jakimiuk AJ, Skorupski P, Jakowicki JA, Postawski K. Evaluation of matrix metalloproteinases-1 and -3 concentrations in the tunica albuginea, the apical wall of atretic follicles and the corpus luteum of normal human ovaries. *Gynecol Endocrinol* 2000;14:25-31.
19. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1986;46:1118-23.
20. Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction a hypothesis. *Biol Reprod* 1980;22:73-106.
21. Leung P, et al. Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Annu Rev Physiol*, AÑO 42:71.
22. Curry T, et al. The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1985;33:981.



Altas concentraciones de estradiol sérico en reproducción asistida

Dr. Eric Saucedo de la Llata, Dra. María Rosa Moraga Sánchez, Dr. Jorge Pezino Rodríguez, Dr. Armando Treviño, Dr. Manuel Leal Almeida, Dr. José Sepúlveda, Dra. Lidia Arenas Montezco, Dr. Genaro García Villafañá, Dr. Víctor Alfonso Batiza Resendiz, Dr. Roberto Santos Haliscak, Dr. Pedro Galache Vega, Dr. Samuel Hernández Ayup.

Resumen

Objetivo. Analizar la influencia de las concentraciones de estradiol el día de aplicación de GCH en índices de gestación (IG) de pacientes de ICSI y ovodonación. **Estudio.** Retrospectivo, comparativo. **Material y métodos.** Se incluyeron 333 pacientes de ICSI y 66 de ovodonación, dividiéndolas según la concentración de estradiol: a) < 1,000 pg/mL, b) 1,001-3,000 pg/mL y c) > 3,000 pg/mL. Protocolo terapéutico: supresión hipofisiaria con acetato de leuprolide en protocolo intermedio, HOC con FSHr y/o HMG, monitoreo ultrasonográfico y estrogénico, aplicación de GCH con más de 3 folículos, mayores de 18 mm, aspiración ovular 34 horas después. Analizamos: IG, edad (incluyendo receptoras), FSH y LH, folículos, óvulos, óvulos metafase II y fertilizados, embriones transferidos, suplementación lútea, catéter y calidad en TE. Análisis estadístico (SPSS 11) con chi al cuadrado, ANOVA y Kruskal Wallis. **Resultados.** ICSI: Edad mayor en grupo A ($p < 0.001$), pero sin diferencia entre grupos B y C ($p = 0.08$). Diferencia estadística en número de folículos, óvulos, óvulos fertilizados y embriones transferidos que fue menor en el grupo A ($p < 0.001$). Diferencia significativa en IG. 21.7, 35.6 y 25.7% en grupos A, B y C respectivamente ($p = 0.032$). Ovodonación: El grupo A fue de menor edad ($p = 0.005$), FSH y LH similares entre grupos. Mayor cantidad de folículos al incrementar cifras de estradiol, pero mayor cantidad de óvulos metafase II y fertilizados en grupo B ($p = 0.05$). IG sin diferencias significativas: 50, 51.5 y 52.3% en grupos A, B y C ($p = 0.977$). No diferencias en edad de receptoras, embriones transferidos, catéter y calidad de la TE en ICSI y ovodonación. **Conclusión.** La aplicación diaria de altas cifras de estradiol y GCH afectan los índices de gestación en pacientes sometidas a ICSI. El mejor resultado se obtiene con concentraciones de estradiol entre 1,000 y 3,000 pg/mL. En ovodonación las altas concentraciones de estradiol no afectan los índices de gestación de las receptoras. ◇

Palabras clave: Estradiol sérico, reproducción asistida, índice de gestación, ovodonación.
(Saucedo de la Llata E, et al. Altas concentraciones de estradiol sérico en reproducción asistida. Ginec Obst Mex 2003;71:585-589).

Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, NL.

54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Primer lugar de Investigación Clínica

Abstract

Objectives. To analyze the influence of the levels of estradiol on the day of HCG in the pregnancy rate (PR) of ICSI and oocyte donation. **Study design.** Retrospective, comparative. **Material and methods.** 333 patients underwent ICSI and 66 in oocyte donation were included dividing them according to the level of estradiol: a) < 1,000 pg/mL, b) 1,001-3,000 pg/mL and c) > 3,000 pg/mL. Therapeutic protocol: Down regulation with acetate leuprolide in late luteal phase, COH with FSHr and/or HMG, ultrasonographic monitoring and estradiol blood levels, HCG application with > 3 follicles > 18 mm, oocyte retrieval 34 hours later. We analyzed: PR, age (including receptors), FSH and LH. Number, mature grade and fertilized oocytes; luteal support, transfer quality and type of catheter. Statistical analysis (SPSS 11) with chi square, ANOVA and Kruskal-Wallis. **Results.** ICSI: Older patients in group A ($p < 0.001$), but without difference between B and C groups ($p = 0.08$). Statistical difference in number of follicles, number of oocytes, fertilized oocytes and transferred embryos being less in the A group ($p < 0.001$). Statistical difference in PR 21.7, 35.6 and 25.7% in A, B and C groups respectively ($p = 0.032$). Oocyte donation: Group A has younger patients ($p = 0.005$), FSH and LH were similar among groups. Major number of follicles were observed to increase estradiol levels, but major quantity of metaphase II and fertilized oocytes were observed in group B ($p = 0.05$). PR without significant differences: 50, 51.5 and 52.3% in groups A, B and C ($p = 0.977$). Without statistical difference in the age of receptors; transferred embryos, type of catheter and quality on ICSI and oocyte donation groups. **Conclusion.** High estradiol levels at the day of HCG application affect the PR in patients submitted to ICSI. The best results were obtained with estradiol levels between 1,000 and 3,000 pg/mL. In oocyte donation the high concentrations of estradiol do not affect the PR of the receptors. ◇

Key words: Seric estradiol, assisted reproduction program, pregnancy rate, oocyte donation.

(Saucedo de la Lata E, et al. High concentrations of serum estradiol in assisted reproduction. Ginec Obst Mex 2003;71:585-589).

Introducción

Se han publicado estudios contradictorios de diferentes autores en relación con la influencia que pueden ejercer las concentraciones de estradiol sérico en los resultados de pacientes que ingresan a programas de reproducción asistida. Algunas publicaciones refieren que las bajas cifras de estradiol pueden afectar los índices de gestación porque alteran la calidad ovular y embrionaria;⁵ otras mencionan que su efecto se ejerce en el endometrio^{1-4,6,7} y algunas más sostienen que las concentraciones de estradiol no alteran los resultados reproductivos.⁸⁻¹⁰

Para analizar más específicamente el efecto estrogénico en la calidad de los óvulos se puede investigar a las donadoras con alta respuesta a la estimulación ovárica, pues en las receptoras el endometrio no es influido por las concentraciones hormonales suprafisiológicas. Es conveniente determinar el efecto del estradiol en la calidad ovular y embrionaria para que si las concentraciones elevadas llegan a alterar el pronóstico re-

productivo sea posible tomar medidas más estrictas de control en la hiperestimulación ovárica.

Objetivo

Determinar la influencia que ejercen las concentraciones de estradiol sérico en el resultado reproductivo de mujeres que ingresan a programas de reproducción asistida al comparar ciclos de ICSI con los de donación ovular.

Material y métodos

Se compararon los índices de gestación de mujeres a quienes se realizó inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en relación con las concentraciones de estradiol sérico determinadas el día de la aplicación de la GCH, posteriormente se compararon dichos resultados con un grupo de pacientes receptoras

de óvulos. Se incluyeron en el estudio todas las mujeres a quienes se realizó ICSI y donación ovular de enero del 2000 a diciembre del 2001, en el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) de Monterrey, Nuevo León.

Las pacientes del grupo de ICSI y las donadoras de óvulos fueron objeto del mismo protocolo de tratamiento. Antes del ciclo de anticoncepción oral se les hizo supresión hipofisiaria con un análogo de GnRH (acetato de leuprolide [Lucrin] a la dosis de 0.1 mg en protocolo intermedio con inicio el día 21 del ciclo previo y suspendido el día de la aplicación de GCH), luego de la hiperestimulación ovárica con FSH recombinante (Gonal F) y/o menotropinas (HMG, Pergonal) a dosis individualizadas para cada paciente.

A todas las pacientes se les realizó monitoreo ultrasonográfico y determinación de concentraciones de estradiol sérico de manera seriada. Cuando se observaron menos de tres folículos mayores de 18 mm se aplicaron 10,000 UI de gonadotropina coriónica humana (Profasi). Luego de 34 horas de la aplicación de la GCH y transferencia embrionaria en el día 3 ó 5, dependiendo de la calidad embrionaria, se realizó la aspiración ovular. Se hizo determinación de BGCH en caso de amenorrea 15 días después de la transferencia embrionaria. Las pacientes recibieron suplementación de la fase lútea con 50 mg IM de progesterona o 100 mg en caso de donación ovular o, bien, progesterona vaginal con crinone al 8 %.

Se realizó un análisis retrospectivo de las pacientes (del grupo ICSI y de donación ovular) a quienes se separó en tres grupos según la concentración de estradiol sérico en el momento de la aplicación de la GCH: grupo A) estradiol sérico menor a 1,000 pg/mL, grupo B) estradiol sérico de 1,001 a 3,000 pg/mL y grupo C) estradiol sérico mayor a 3,001 pg/mL.

En los grupos de ICSI se analizaron las siguientes variables independientes: edad de las pacientes, número de folículos, número de óvulos obtenidos, óvulos

fertilizados, número de embriones transferidos, tipo de catéter utilizado durante la transferencia embrionaria y calidad de la misma, así como tipo de complementación lútea. La variable dependiente fue el índice de gestación. En los grupos de donación ovular se compararon las mismas variables, además de la edad de la receptora, concentraciones séricas de FSH y LH en el día 3 del ciclo (en la donadora) y óvulos metafase II.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 11. Se compararon las variables cualitativas con chi al cuadrado y las cuantitativas con ANOVA (paramétricas) y Kruskal-Wallis (no paramétricas).

Se comparó la influencia que pueden ejercer las concentraciones de estradiol sérico en los resultados de las pacientes que ingresaron a programas de reproducción asistida tanto de ciclos en fresco con ICSI como de donación ovular para determinar indirectamente si la calidad ovular y embrionaria podría verse afectada por los concentraciones hormonales, o si el efecto del estradiol podría ejercer alguna acción en el endometrio, con influencia deletérea para la implantación.

Resultados

Se incluyeron al estudio 333 pacientes a quienes se realizó ICSI y a 66 pacientes del programa de donación ovular del Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) de Monterrey, NL. Las características de cada uno de los grupos, dependiendo de su concentración de estradiol sérico el día de la aplicación de GCH, se muestran en los Cuadros I y II.

En relación con las pacientes del grupo de ICSI, la edad fue mayor en quienes tenían estradiol sérico <1,000 pg/mL ($p < 0.001$). No se encontró diferencia significativa entre los grupos B y C con respecto a la edad ($p = 0.08$). Los tres grupos tuvieron una diferen-

CUADRO I. Influencia de concentraciones de estradiol sérico en mujeres que ingresaron a ICSI

	Grupo A < 1000 pg/mL	Grupo B 1001-3000 pg/mL	Grupo C > 3001 pg/mL	P
Edad	34.07 ± 4.23	32.01 ± 4.22	32.80 ± 4.47	< 0.001
Folículos	7.15 ± 4.23	12.52 ± 5.38	10.65 ± 6.24	< 0.001
Óvulos	5.56 ± 3.33	10.26 ± 5.30	8.82 ± 6.10	< 0.001
Óvulos fertilizados	3.26 ± 1.93	5.45 ± 2.87	4.72 ± 3.19	< 0.001
Embriones transferidos	2.46 ± 0.98	3.06 ± 0.86	2.78 ± 0.96	< 0.001
Gestaciones	33 (21.7%)	52 (35.6%)	9 (25.7%)	0.05

CUADRO II. *Influencia de concentraciones de estradiol sérico en pacientes de un programa de donación ovular*

	Grupo A < 1,000 pg/mL	Grupo B 1,001-3,000 pg/mL	Grupo C > 3,001 pg/mL	P
Edad donadora	30.31 ± 3.88	27.45 ± 3.93	25.77 ± 3.94	0.006
FSH 3 donadora	5.05 ± 0.87	5.08 ± 1.16	5.96 ± 1.76	0.318
LD d3 donadora	2.52 ± 0.84	4.61 ± 2.87	2.00 ± 0.41	0.028
Folículos	8.31 ± 4.03	14.18 ± 4.91	15.73 ± 5.85	< 0.001
Óvulos	7.62 ± 4.00	13.79 ± 5.65	13.18 ± 4.81	< 0.001
Óvulos metafase II	5.23 ± 2.52	11.45 ± 4.74	9.09 ± 5.25	< 0.001
Óvulos fertilizados	4.85 ± 1.95	7.33 ± 4.21	8.59 ± 4.94	0.043
Edad receptora	35.45 ± 4.11	39.17 ± 5.70	38.83 ± 4.95	0.142
Embriones transferidos	3.15 ± 0.99	3.03 ± 0.95	3.09 ± 1.23	0.934
Gestaciones	6 (50%)	17 (51.5%)	11 (52.3%)	

cia estadística con respecto al número de folículos, óvulos y óvulos fertilizados, que fue menor en el grupo con estradiol <1,000 pg/mL ($p < 0.001$). Por lo que se refiere a la cantidad de embriones transferidos, en los grupos B y C se encontró mayor número de embriones que en el grupo A ($p < 0.001$), dicha diferencia no fue significativa cuando se compararon los grupos B y C ($p = 0.870$). La calidad de la transferencia, el tipo de catéter y la forma de complementación lútea no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos ($p = 0.154$, $p = 0.505$ y $p = 0.761$).

De las 333 pacientes a quienes se realizó ICSI, 152 tuvieron concentraciones de estradiol <1,000 pg/mL con un índice de gestación (IG) de 21.7%. Treinta y cinco mujeres tenían cifras de estradiol >3,000 pg/mL y nueve presentaron embarazo (IG del 25.7%); por último, 146 pacientes tuvieron concentraciones de estradiol sérico entre 1,001 y 3,000 pg/mL y 52 de ellas se embarazaron (IG de 35.6%). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las pacientes del grupo B (1,001-3,000 pg/mL) y las de los dos grupos restantes ($p = 0.032$).

En relación con las pacientes donadoras de óvulos, al comparar la edad, podemos observar que las mujeres con cifras menores de estradiol fueron de menor edad (30.3 años en el grupo A, 27.4 en el grupo B y 25.7 en el grupo C). La diferencia entre los grupos A y C fue estadísticamente significativa ($p = 0.005$); sin embargo, esto no ocurrió al comparar el grupo A con el B ($p = 0.09$), o el grupo B con el C ($p = 0.37$). Los concentraciones de FSH en el día 3 no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos ($p = 0.318$) y las concentraciones de LH sólo tuvieron una diferencia significativa entre el grupo A y B ($p = 0.041$).

La cantidad de folículos, óvulos y óvulos metafase II entre los tres grupos tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Se obtuvo mayor cantidad de folículos conforme se incrementaron las

cifras séricas de estradiol; sin embargo, la diferencia entre el grupo B y C no fue significativa ($p = 0.07$); el mismo efecto ocurrió con el número de óvulos y óvulos metafase II en donde la diferencia se estableció al comparar el grupo A con los grupos B y C, pero no fue así cuando se comparó la cantidad de óvulos en el grupo B y C ($p = 0.755$) o, bien, la cantidad de óvulos metafase II ($p = 0.066$).

Tampoco existieron diferencias significativas en la cantidad de óvulos fertilizados entre los grupos B y C ($p = 0.276$), pero al realizar comparaciones entre el grupo A con los otros dos grupos, observamos una diferencia estadística ($p = 0.043$). En las donadoras de óvulos, al comparar los tres grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar los resultados en los siguientes parámetros: edad de receptoras ($p = 0.142$), embriones transferidos ($p = 0.934$), calidad de la transferencia ($p = 0.154$), tipo de catéter utilizado durante la transferencia embrionaria ($p = 0.505$) o tipo de suplementación lútea ($p = 0.761$).

Al analizar los resultados en términos de embarazo, observamos que seis pacientes lograron embarazarse en el grupo con estradiol menor a 1,000 pg/mL de un total de 12 (IG de 50%). Treinta y tres mujeres tuvieron cifras de estradiol sérico entre 1,001 y 3,000 pg/mL y de ellas 17 se embarazaron (IG del 51.5%). Veintiún pacientes se situaron en el grupo C (estradiol > 3,001 pg/mL) y de ellas, 11 se embarazaron (IG del 51.5%). No se demostró una diferencia estadísticamente significativa entre los IG al comparar los tres grupos de pacientes ($p = 0.977$).

Discusión

En la literatura mundial existen pocas publicaciones que hayan estudiado los efectos de las concentraciones

de estradiol en los resultados de pacientes que ingresan a programas de reproducción asistida. Mientras Chenette,⁸ Sharara⁹ y Yu Ng¹⁰ defienden que las concentraciones suprafisiológicas de estradiol no tienen influencia sobre el pronóstico reproductivo, existen otros pocos autores que refieren el efecto adverso de altas cifras hormonales a nivel ovular y embrionario⁵ o endometrial.^{1-4,6,7} En nuestro país, Kably ha demostrado, en 198 ciclos, el pobre pronóstico que acompaña a las pacientes con bajas cifras de estradiol el día de la administración de GCH.⁵

En el presente trabajo se demuestra, en 333 ciclos en fresco, que la existencia de cifras de estradiol mayores de 3,000 pg/mL el día de la administración de GCH tiene un menor índice de gestación que pacientes con cifras entre 1,000-3,000 pg/mL. En congruencia con el trabajo de Kably, las mujeres con cifras menores a 1,000 pg/mL de estradiol tienen peor pronóstico reproductivo que quienes tienen mayores concentraciones hormonales. Al analizar 66 ciclos de donadoras de óvulos no encontramos diferencias significativas en los índices de embarazo, independientemente de las concentraciones de estradiol el día de la aplicación de la GCH.

Con base en los resultados obtenidos en los dos grupos de pacientes, se demuestra que las concentraciones

de estradiol mayores de 3,000 pg/mL en las pacientes objeto de hiperestimulación ovárica afectan el resultado reproductivo; esto no ocurrió en receptoras de óvulos que no han estado expuestas a altas cifras de estradiol. Lo anterior apoya lo que se demuestra en publicaciones en relación con el hecho de que altas cifras de estradiol pueden tener un efecto deletéreo en la implantación. Éste es el trabajo más amplio en la literatura mundial que apoya dicha hipótesis.

Conclusión

Es necesario investigar diferentes variables que puedan afectar los resultados de pacientes que ingresan a programas de reproducción asistida. Si las altas cifras de estradiol sérico afectan los índices de gestación en pacientes con hiperestimulación ovárica convendría indicar esquemas de estimulación poco agresivos, vigilando que las concentraciones séricas de la hormona se sitúen entre 1,000 y 3,000 pg/mL. Al contrario de lo anterior, en pacientes donadoras de óvulos pueden indicarse esquemas de estimulación que permitan obtener números mayores de óvulos, sin afectar lo anterior los índices de embarazo en las receptoras. ◇

Referencias

1. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Embryo implantation after human in vitro fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1990;53:870-4.
2. Simon C, Cano F, Valbuena D, et al. Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995;10:2432-37.
3. Pellicer A, Valbuena D, Cano F, et al. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril* 1996;65:1190-5.
4. Forman R, Fries N, Testart J, et al. Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation. *Fertil Steril* 1998;49:118-22.
5. Kably A, Barrón J, Tapia RC, et al. Effect of blood concentrations of preovulatory estradiol on the quality of eggs and pre-embryos in patients treated with fertilization in vitro. *Ginecol Obstet Mex* 2000;86:435-41.
6. Yang JH, Chen HF, Lien YR, et al. Elevated E2:oocyte ratio in women undergoing IVF and tubal ET. Correlation with a decrease in the implantation rate. *J Reprod Med* 2001;46:434-8.
7. Mahutte NG, Duleba AJ, Taylor HS, et al. Elevated estradiol levels are associated with increased miscarriage rates in women undergoing IVF/ICSI. *Fertil Steril* 2002;78:S253.
8. Chenette PE, Sauer MV, Paulson RJ. Very high serum estradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;54:858-63.
9. Sharara FI, Mc Clamrock HD. High estradiol levels and high oocyte yield are not detrimental to in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1999;72:401-5.
10. Yu Ng EH, Yeung WS, Yee Lan LE et al. High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2000;15:250-5.



Valores iniciales de la gonadotrofina coriónica humana como pronóstico de la evolución del embarazo en reproducción asistida

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dra. Esperanza Carballo Mondragón,
Dr. Ernesto Castelazo Morales, Dr. Samuel Karchmer Krivitsky

Resumen

Introducción. En los programas de reproducción asistida es importante, tanto para el equipo médico como para la paciente, poder predecir la evolución del embarazo. Se ha postulado la determinación de concentraciones de pregnandiol o proteína placentaria 14 como factores predictivos; sin embargo, la determinación de hCG es, al parecer, el parámetro más adecuado para detectar alteraciones tempranas en el desarrollo del embarazo. **Objetivo.** Establecer los valores predictivos de hCG que establecen el pronóstico de evolución del embarazo, mediante el análisis de las cifras en el día 14 y 16 postransferencia, y determinar los valores de hCG para predecir embarazo múltiple. **Material y métodos.** Se analizaron de manera retrospectiva los datos de 88 pacientes que ingresaron al programa de fertilización *in vitro* en los que se logró el embarazo, y se realizó determinación de hCG en el día 14 y 16 postransferencia. Para su estudio, las pacientes se dividieron en tres grupos: 1) embarazo mayor 26 semanas, 2) embarazo menor de 26 semanas y 3) embarazo químico. El análisis de los resultados se efectuó con la prueba de ANOVA para comparar medias y curvas ROC para determinar sensibilidad y especificidad. **Resultados.** Se observó diferencia significativa en las concentraciones de hCG en el día 14 y 16 postransferencia entre los grupos de pacientes. Las concentraciones de hCG el día 14 postransferencia de 113 UI/L, y el día 16 concentraciones de hCG de 403 UI/L mostraron una sensibilidad del 80 y 79% respectivamente, con especificidad del 79 y 75%, mientras que el incremento de hCG entre estos días mayor a 200.33 UI/L ofrece una sensibilidad y especificidad del 80 y 83%, respectivamente, para una evolución del embarazo más allá de 26 semanas. Para detectar concentraciones de hCG como predictivas de embarazo de alto orden fetal se observó que las concentraciones de hCG en el día 14 de 270.42 UI/L tienen una sensibilidad del 91% con una especificidad del 64%, concentraciones en el día 16 mayores de 837.14 UI/L una sensibilidad y especificidad del 91 y 62%, respectivamente. **Conclusiones.** La determinación de concentraciones de hCG mayores a 113 en el día 14 y de 403 en el día 16 ofrece una sensibilidad y especificidad adecuadas como pronóstico para la evolución del embarazo más allá de las 26 SDG, mientras que las concentraciones de hCG de 270.42 y de 837.14 en los días 14 y 16, respectivamente, ofrecen una sensibilidad muy elevada de 91% para embarazo múltiple. ◇

Palabras clave: Gonadotropina coriónica humana, embarazo, reproducción asistida.

(Kably Ambe A, et al. Valores iniciales de la gonadotropina coriónica humana como pronóstico de la evolución del embarazo en reproducción asistida. Ginec Obst Mex 2003;71:590-599).

Hospital Ángeles de Las Lomas. Centro Especializado para la Atención de la Mujer. Unidad de Reproducción Asistida

54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Segundo lugar de Investigación Clínica

Introduction. In assisted reproduction programs, once a pregnancy has been achieved, the power of predicting its evolution is important for the medical team as well as for the patient. The determination of pregnanediol or of placental protein 14 levels has been postulated as a predictive factor, however, the determination of hCG is, seemingly, the most adequate parameter for the detection of early developmental alterations during pregnancy. **Objective.** To determine those predictive values of hCG which establish a prognosis concerning the evolution of pregnancy through the analysis of the values of this hormone on post-transference days 14 and 16, as well as to determine hCG values for multiple pregnancies. **Material and methods.** Data from 88 patients participating in the in vitro fertilization program, in whom pregnancy was achieved, were retrospectively analyzed, and hCG levels were determined on post-transference days 14 and 16. Results were analyzed by the ANOVA test in order to compare mean values, & ROC were used to determine sensitivity and specificity. **Results.** The patients were divided in three groups: 1) pregnant for more than 26 weeks; 2) pregnant for less than 26 weeks; and 3) chemical pregnancy. Significant differences in hCG levels on post-transference days were observed among these groups of patients. The levels of hCG, on post-transference day 14, 113 IU/L, and on day 16, 403 IU/L, presented, respectively, an 80% and 79% specificity, while the greater than 200.33 IU/L hCG increase offers a sensitivity and specificity of 80% and 83%, respectively, for a pregnancy of more than 26 weeks. In order to consider hCG levels as predictive for a high fetal order pregnancy, it was observed that hCG levels of 270.42 UI/L on day 14 present a sensitivity of 91% with a specificity of 64%, and levels higher than 837.14 IU/L on day 16 offer a sensitivity and specificity of 91% and 62%, respectively. **Conclusions.** The determination of hCG levels greater than 113 IU/L on day 14 and greater than 403 IU/L on day 16 offer adequate sensitivity and specificity as predictive factors for pregnancy evolution beyond the 26 GW, while hCG levels of 270.42 and 837.14, respectively, on days 14 and 16 offer a very high sensitivity (91%) for multiple pregnancy. ◇

Key words: Human chorionic gonadotropin, pregnancy, assisted reproduction programs.

(Kably Ambe A, et al. Initial values of human chorionic gonadotropin as a prognostic variable of pregnancy evolution in assisted reproduction. Ginec Obst Mex 2003;71:590-599).

Introducción

En el análisis de los resultados de las técnicas de reproducción asistida, uno de los mayores retos a los que se enfrenta el médico, es poder realizar una observación confiable de todas las variables que influyen sobre los mismos. Un ejemplo de lo anterior lo constituye la evaluación de los parámetros que traen consigo la consecución de un embarazo y que van desde los clínicos, como la edad de la mujer o el índice de masa corporal, y de gabinete, como las determinaciones de estradiol, las características ecsonográficas del endometrio antes de la transferencia o, bien, los de laboratorio, como los que destacan la organización física del mismo, hasta la técnica de transferencia embrionaria, pasando por otros, como la calidad embrionaria y las tasas de fertilización e implantación. Cuando todas estas variables se evalúan y se consigue un embarazo, el clínico se ve

ante la disyuntiva, relativamente apresurada, de establecer un pronóstico temprano de la evolución de la gestación. A diferencia de los embarazos obtenidos espontáneamente, la pareja que ingresa a un programa de reproducción asistida exige un pronóstico más exacto y temprano de la evolución de la gestación. El gasto económico, emocional y físico que implica procedimientos de esta índole, establece una ansiedad en la pareja que puede ser atenuada con información veraz, basada en hechos y en la experiencia de la propia clínica que otorga el servicio.

Por lo anterior, se realizaron evaluaciones hormonales y proteínicas para poder establecer porcentualmente cuál será el pronóstico de un embarazo logrado mediante reproducción asistida.

Se ha propuesto que las concentraciones de hCG en el día 14 postransferencia pueden servir como pronóstico para predecir la evolución del embarazo y ofre-

cer una herramienta para explicar a la paciente cuál es el panorama esperado del embarazo.

La producción de hCG se inicia siete días después de la concepción y es producida por la capa trofoblástica del blastocisto, y puede detectarse en el suero materno al momento de la implantación.¹ Las concentraciones de hCG aumentan rápidamente duplicando su valor entre 1.3 y 2.3 días, esto se observa más en etapas tempranas.² Lenton y su grupo³ demostraron que el incremento puede dividirse en dos fases: rápida, que se atribuye al proceso de implantación (11 días posteriores al pico de LH), y una lenta en la que la hCG trofoblástica y la circulante muestran equilibrio.

Junto con las concentraciones de hCG se han evaluado otras sustancias que permitan predecir la evolución del embarazo, como el pregnandiol durante el primer trimestre,² u otros productos fetoplacentarios, como la proteína placentaria 14 (PP14) o la proteína Schwangerschaft (SP 1);⁴ sin embargo, la titulación de la subunidad beta hCG sigue siendo el parámetro más adecuado para detectar tempranamente alteraciones en el desarrollo del embarazo.

La hCG tiene funciones biológicas importantes durante etapas tempranas de la gestación, la principal es estimular al cuerpo lúteo (efecto luteotrófico) para favorecer su crecimiento y adecuada producción de esteroides.²

Heiner,⁵ o Guth⁶ han observado una correlación directa entre las concentraciones de hCG en los días 13, 14 ó 16 y la evolución del embarazo, ya que a mayores concentraciones de hCG mejor pronóstico de éste.

Existen reportes de otros estudios, como el de Ertzeid⁷ realizado en Noruega, en el que se compararon concentraciones de hCG sérica los días 14, 16, 20 y 27 después de la ovulación en pacientes que lograron un embarazo con embrión único, que llegó a término, incluidas pacientes de fertilización *in vitro* (FIV) o inseminación artificial homóloga (IAH), y se observó que el parámetro más importante para evaluar el pronóstico del embarazo no eran las concentraciones de hCG, sino el tiempo en que tardaban en duplicarse. En ese estudio se estableció que las tasas de aborto y embarazo ectópico eran mayores cuando el tiempo para duplicar las concentraciones de esta hormona era mayor. El estudio de Check⁸ concuerda con estos resultados pues reporta un tiempo de dos días, lapso en el cual sí se duplican los valores de hCG y el pronóstico para la evolución del embarazo es bueno. Lenton, et al.¹ reportaron, igualmente, que el incremento lento de la hCG se asocia con “embarazos químicos” y mayor tasa de abortos. En estudios recientes los investigadores se enfocan a determinar qué valores cuantitativos de la subunidad beta de hCG ofrecen mayor sensibilidad y

especificidad para poder predecir la evolución del embarazo: Gillian,⁹ en un estudio de 662 pacientes, evaluó las titulaciones de hCG en el día 16 posovulación y observó que concentraciones menores de 50 UI/L eran de mal pronóstico, con un riesgo de 35 % de culminar en aborto, mientras que con titulaciones de 500 UI/L o más el riesgo fue de 5 %. Sugantha, *et al.*,¹⁰ determinaron en 429 pacientes que ingresaron a programas de inseminación artificial o fertilización *in vitro*, la cantidad de hCG en los días 14 y 21 posinseminación o postransferencia de embriones, y observaron que las pacientes con valores de hCG menores de 50 y 200 UI/L en los días 14 y 21, respectivamente, tenían una probabilidad de nacimiento de 0 % y de aborto de 72 %, mientras que en las pacientes con más de 50 UI/L en el día 14 y de 1,000 UI/L o mayor en el día 21, las probabilidades de tener un hijo vivo son de 90 %, y de abortar de 8 %.

Por todo lo anterior, se decidió determinar los valores predictivos de la subunidad beta de hCG para establecer un pronóstico de la evolución del embarazo en nuestro medio, mediante el análisis de las cifras de dicha hormona obtenidas los días 14 y 16 postransferencia en pacientes que ingresaron al programa de fertilización *in vitro*.

Material y métodos

Se analizaron de manera retrospectiva los datos de las pacientes que ingresaron al programa de fertilización *in vitro* y que lograron el embarazo diagnosticado por titulaciones de hCG mayores de 1 UI/mL en la Clínica de Reproducción Asistida del Centro Especializado para la Atención de la Mujer del Hospital Ángeles de las Lomas, entre enero del 2000 y diciembre del 2002.

Los criterios de exclusión fueron: 1) pacientes que no contaran con titulación de hCG en los días 14 y 16 postransferencia ó 2) pacientes en las que no se logró seguir la evolución y resolución del embarazo.

En todos los casos se determinó la titulación de hCG sérica 14 y 16 días postransferencia a través de quimioluminiscencia, con una sensibilidad de 1 UI/mL. Las pacientes se estimularon con FSH recombinante (Gonal F®) siguiendo un protocolo largo con acetato de leuprolide 0.5mg/día (Lucrin Kitt®), o con antagonistas de GnRH Cetorelix 0.25 mg/día (Cetrotide®) como ha sido publicado por nuestro grupo.¹¹

El soporte de fase lútea se realizó con progesterona IM 100 mg cada 12 horas (Cuerpo Amarillo Fuerte®) dos semanas después de la titulación de hCG con la finalidad de observar sacos gestacionales intrauterinos.

Para fines exclusivos del estudio, la definición de embarazo se dividió en:

- I) *Viable*: embarazos en los que uno o más productos nacieron (vivo o muerto) después de las 26 semanas, incluidos los embarazos en los que se observaron dos o más sacos gestacionales con embrión vivo, y que a lo largo del embarazo uno de ellos no continuó su desarrollo.
- II) *No viable*: embarazos en los que se detectó una subunidad beta hCG positiva, pero no se logró observar saco gestacional intrauterino; embarazos ectópicos, en los que se corroboró un aborto clínico y gestaciones que culminaron antes de las 26 semanas. El análisis estadístico se realizó a través de prueba de ANOVA para comparar medias geométricas entre los grupos. Se utilizaron curvas ROC para poder determinar el punto de corte que ofreciera mayor sensibilidad y especificidad de los valores de hCG como pronóstico para la evolución del embarazo, con el programa estadístico SPSS® (Microsoft Co.).

Resultados

Se incluyeron 88 pacientes en el periodo comprendido entre enero del 2000 a diciembre del 2002, que lograron el embarazo con FIV-TE- ICSI.

La edad media de las pacientes fue de 34.16 ± 4.64 años. Las pacientes se dividieron en tres grupos de acuerdo con la finalización de la gestación: a) embarazo mayor de 26 semanas, b) embarazo menor de 26 semanas y c) embarazo químico.

La media geométrica de las concentraciones de hCG en cada uno de los grupos, en los días 14 y 16 se

muestra en el cuadro I.

También se valoró la media geométrica del incremento de hCG entre el día 14 y 16 para cada uno de los grupos, observando que éste era mayor en las pacientes que finalizaban su embarazo después de las 26 semanas en relación con los otros dos grupos (Cuadro II).

Se realizó prueba de ANOVA para detectar diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$ entre los concentraciones de hCG para cada uno de los grupos en ambas determinaciones de gonadotropina coriónica humana (días 14 y 16), e igualmente el incremento de la subunidad beta de hCG fue significativamente diferente entre los grupos (figuras 1 y 2).

Para determinar la sensibilidad y especificidad, se tomó como punto de corte la percentila 5 de la media geométrica; asimismo, a través de curvas ROC se obtuvo el valor de hCG con mayor sensibilidad y especificidad, en función de la culminación del embarazo en los días 14 y 16 del ciclo, coincidiendo ambas determinaciones en que un valor de 113 UI/L de hCG en el día 14 tuvo una sensibilidad del 80 % con especificidad del 71 % para un embarazo mayor de 26 semanas (figura 4).

En cuanto a los valores de hCG en el día 16, un valor de 403 UI/L o más estableció una sensibilidad del 79 %, con una especificidad del 75 % (Figura 5), y finalmente el parámetro que mostró mayor sensibilidad y especificidad (80 y 83 %, respectivamente), fue el incremento de la hCG. Se observó que un aumento de 200.33 UI/L en 48 horas garantiza un buen pronóstico para que el embarazo continúe más allá de las 26 semanas (Figura 6).

La incidencia de embarazo de alto orden fetal (tres

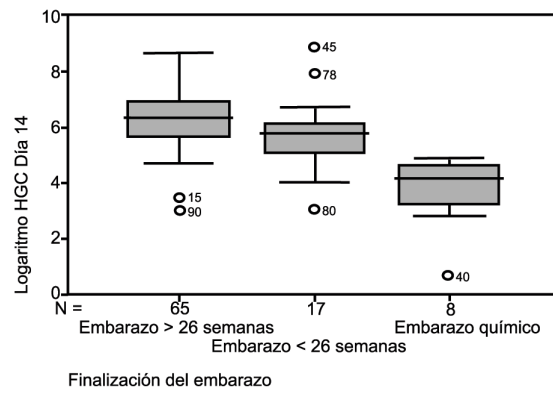
CUADRO I. Medias geométricas de hGC en día 14 y 16 de acuerdo a la resolución del embarazo

Finalización del embarazo	hGC día 14 (UI/L)	hGC día 16 (UI/L)
Embarazo mayor de 26 semanas	512.85	2,121.50
Embarazo menor de 26 semanas	249.85	1,236.45
Embarazo químico	91.83	120.30

CUADRO II. Medidas geométricas del incremento de hGC

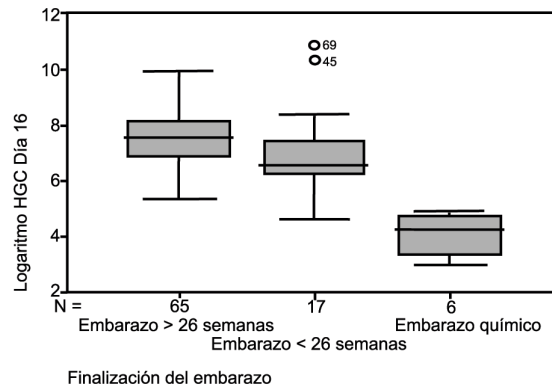
Finalización del embarazo	Incremento del hGC (día 14 a 16)
Embarazo mayor de 26 semanas	1,408.10
Embarazo menor de 26 semanas	962.9
Embarazo químico	26.57

FIGURA 1



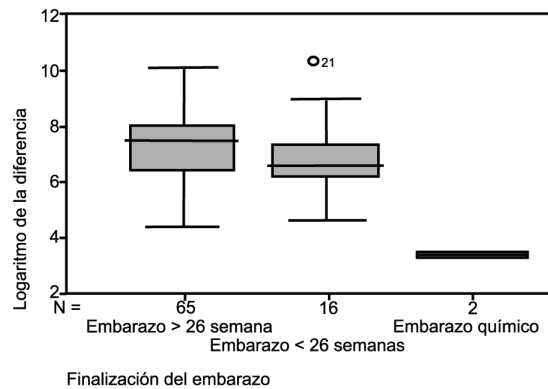
Medias geométricas de hCG en día 14.

FIGURA 2



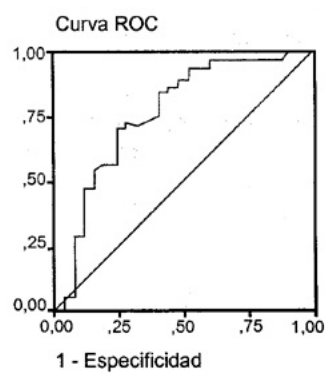
Medias geométricas hCG día 16.

FIGURA 3



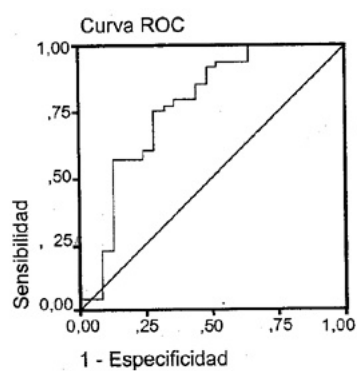
Medias geométricas de incremento de hCG día 14 a día 16.

FIGURA 4



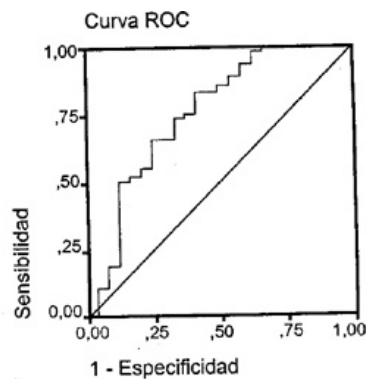
Sensibilidad y especificidad para concentraciones de hCG día 14.

FIGURA 5



Sensibilidad y especificidad para concentraciones de hCG día 16.

FIGURA 6



Sensibilidad y especificidad para incremento en concentraciones de hCG.

o más sacos) fue de 13.33 %, y de gemelares dobles de 26.6 %, por lo que se correlacionaron las concentraciones de hCG en el día 14 y 16 con la existencia de embarazo múltiple. Se compararon las medias geométricas de la hCG de las pacientes en los días 14 y 16, así como su incremento, al dividir a las pacientes en cuatro grupos: a) en quienes no se observó saco gestacional, b) en quienes se observó un saco gestacional, c) observación de dos sacos gestacionales y d) tres o más sacos gestacionales.

Al analizar la comparación estadística de las medias geométricas se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos en el día 14, 16 y el incremento entre ambas (figuras 7, 8 y 9).

Cuando se realizaron las curvas ROC para evaluar sensibilidad y especificidad de los concentraciones de hCG, en función de embarazos de alto orden fetal, y al tomar como punto de corte la percentila 5 de la media geométrica, se estableció qué valores de hCG mayores de 270.42 UI/L el día 14 del ciclo presentaban una especificidad de 64 %, pero una sensibilidad del 91 % para embarazo múltiple; en el día 16 las concentraciones de hCG mayores de 837.14 UI/L tenían una sensibilidad del 91 % con especificidad del 62 %. El incremento en las concentraciones de hCG en 48 horas por arriba de 555.57 UI/L ofrece una sensibilidad del 91 % con una especificidad del 62 % (Figuras 10,11,12).

Discusión

La utilidad de la hCG como valor pronóstico para el desarrollo del embarazo ha sido cada vez más utilizada por los grupos de reproducción asistida.^{1,4-6,9}

En el presente trabajo, al correlacionar las concentraciones de hCG en los días 14 y 16 con base en la evolución del embarazo, se observó que las pacientes con embarazo químico o con un aborto o pérdida del embarazo antes de las 26 semanas tenían concentraciones menores de hCG, en relación con las pacientes en las que el embarazo finalizó después de las 26 semanas, resultados que coinciden con lo reportado por Al Sebai¹² y Schmidt.¹³

Bjercke¹⁴ demostró que las concentraciones de 55 UI/L de hCG en el día 12 postransferencia muestran una sensibilidad de 0.73 y especificidad de 0.83 para discriminar pérdidas tempranas de embarazos a término. Autores como Sgantha¹⁰ refieren que las concentraciones de 200 UI en el día 21 tienen una sensibilidad del 53 % con especificidad del 99 % para el desarrollo de un embarazo viable.

Los datos obtenidos en el presente estudio ofrecen resultados similares, observando que las concentracio-

nes de hCG en el día 14, mayores de 113 UI/L, tienen una adecuada sensibilidad y especificidad (80 y 71 %, respectivamente), que difieren por ser mayores a lo informado por Bjercke, et al.¹⁴ No obstante, hay que tomar en cuenta que estos se realizaron el día 12 postransferencia, mientras que en el presente estudio la determinación de hCG se efectuó el día 14.

Existen otros autores que coinciden ampliamente con los resultados reportados en este trabajo, como Heiner, et al.,¹⁵ quienes determinaron que las concentraciones de 100 UI/L discriminaban perfectamente entre embarazos viables (> 100 UI/L) de los no viables (< 100 UI/L).

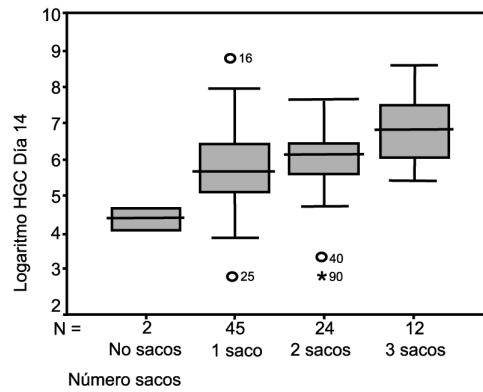
De acuerdo con nuestros resultados, el parámetro que muestra mayor sensibilidad y especificidad para el desarrollo de un embarazo a los límites de la viabilidad fue el incremento de la hCG por arriba de 200 UI/L en 48 horas, parámetro que coincide con lo reportado por Check, et al.,⁸ o Sgantha, et al.,¹⁰ quienes también mencionan que el tiempo en que se duplican las concentraciones de gonadotropina coriónica humana tiene mejor valor pronóstico.

Una de las complicaciones frecuentes a las que deben enfrentarse la mayor parte de los centros de reproducción asistida es el embarazo múltiple. La tasa de embarazo múltiple observada fue de 13.33 %.

Al tratar de correlacionar las concentraciones de hCG con el embarazo de alto orden fetal (tres o más sacos gestacionales), al igual que lo reportado por Glatsstein¹⁶ y Legro,¹⁷ se observó que las concentraciones de hCG en los días 14 y 16 y el incremento de ésta, eran mayores en estos casos (1012.3 UI/L, 3904.9 UI/L y 2465.13 UI/L respectivamente) en comparación con embarazos dobles o únicos.

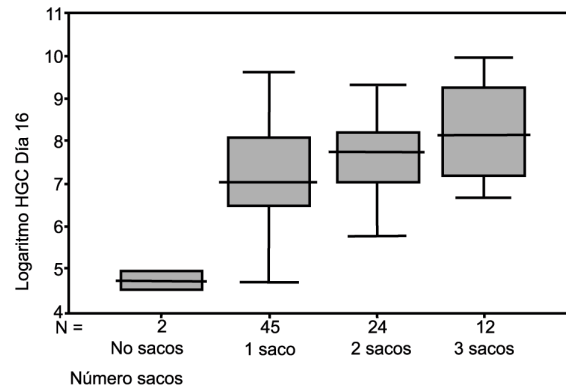
Sin embargo, al tratar de establecer una cifra que ofrezca un valor predictivo, al tomar la percentila 5 como punto de corte, se observó que en el día 14 y 16, las concentraciones mayores a 270.42 UI/L y 837.14 UI/L, respectivamente, mostraban adecuada especificidad (91 %); sin embargo, la sensibilidad era baja (62-64 %). Igualmente, el incremento de la hCG por arriba de 555.57 UI/L es bastante específico pero poco sensible, coincidiendo con lo informado por Sgantha, et al.,¹⁰ quienes observaron un punto de corte de 100 UI/L en el día 14 para embarazo múltiple con sensibilidad del 85 % y especificidad del 74 %. En conclusión, puede mencionarse que las concentraciones de la determinación de hCG en los días 14 y 16, así como su incremento en este lapso, pueden utilizarse como factor predictivo del desarrollo de embarazos logrados a través de un programa de FIV-TEICSI. Las concentraciones de hCG mayores a 113 UI/L en el día 14 postransferencia ofrecen un pronóstico del 80 % de que el

FIGURA 7



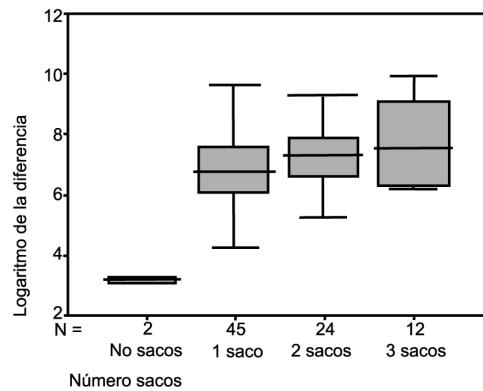
Concentraciones de hCG día 14 en relación al número de sacos gestacionales observados.

FIGURA 8



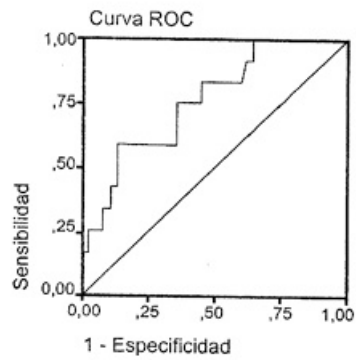
Concentraciones de hCG día 16 en relación al número de sacos gestacionales observados.

FIGURA 9



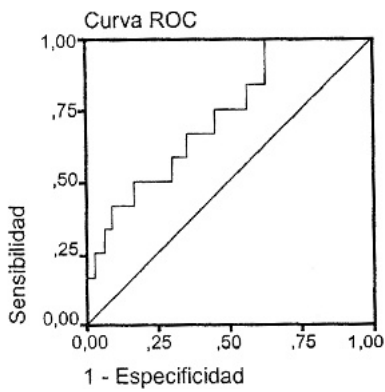
Incremento de hCG día 14 a día 16 en relación al número de sacos gestacionales observados.

FIGURA 10



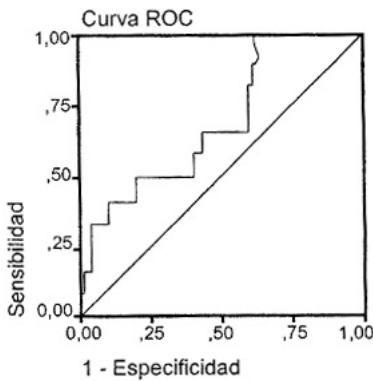
Sensibilidad y especificidad para embarazo múltiple (concentraciones de hCG día 14).

FIGURA 11



Sensibilidad y especificidad para embarazo múltiple (concentraciones de hCG día 16).

FIGURA 12



Sensibilidad y especificidad para embarazo múltiple (Incremento hCG).

embarazo evolucione más allá de las 26 semanas. Además, las cantidades de hCG en el día 16 por arriba de 403 UI/L establecen que el embarazo culminará en aborto o antes de las 26 semanas en sólo 21 % de los casos. El parámetro que mejor pronóstico ofrece es el incremento de la hCG, ya que si dicho incremento es mayor a 200.33 UI/L en 48 horas (día 14 a 16) la

posibilidad de que el embarazo se pierda antes de las 26 semanas es del 20 %.

Los conocimientos anteriores permiten explicar a las pacientes, de manera temprana, el pronóstico que se espera del embarazo, circunstancia que puede aportar cierta tranquilidad emocional al personal del equipo de reproducción asistida y a la paciente. ◇

Referencias

1. Lenton EA, Neal LM, Sulaiman R. Plasma concentrations of human chorionic gonadotrophin from the time of implantation until the second week of pregnancy. *Fertil Steril* 1982;37:773-78.
2. Chard T. Pregnancy tests: A review. *Hum Reprod* 1992;7:701-10.
3. Lenton EA, Hooper M, King H, Kumar A, Manks N. Normal and implantation in spontaneous *in vivo* and *in vitro* human pregnancies. *Fertil* 1991;92:555-65.
4. Ho PC, Chan SYW, Tang GWK. Diagnosis of early pregnancy by enzyme immunoassay of swangerschafts-protein 1. *Fertil Steril* 1988;49:76-80.
5. Heiner JS, Kerin JF, Schimdt LL, Jackson T. Can a single, early quantitative human chorionic gonadotrophin measurement in an *in vitro* fertilization-gamete intrafallopian transfer program predict pregnancy outcome? *Fertil Steril* 1999;58:373-77.
6. Guth B, Hudelson J, Higbie B, Solomon S, Polley S, Thomas S. Predictive value of hCG level 14 days after embryo transfer. *J Asit Reprod Genet* 1995;12:13-14.
7. Ertzeid G, Tanbo T, Dale C, Storeng R, Morkrid L. Human chorionic gonadotrophin levels in successful implantations after assisted reproduction techniques. *Gynecol Endocrinol* 2000;14:258-63.
8. Check JH, Lis JR, Katz Y, Shucoski KI. Poor prognosis for successful pregnancy with slow rising beta-human chorionic gonadotrophin (hCG) levels even with fetal viability at eight weeks. *Fertil Steril* 2002;76 Supl:187.
9. Gillian H, Brown S, Moran J, Homan S, Kerin J. Human chorionic gonadotrophin as a predictor of outcome in assisted reproductive technology pregnancies. *Fertil Steril* 2000;73:270-74.
10. Sugantha SE, Webster S, Sundar E, Lenton EA. Predictive value of plasma human chorionic gonadotrophin following assisted conception treatment. *Hum Reprod* 2000;5:469-73.
11. Kably AA, Ruiz A J, Baptista AP, Serulle TY, Quesnel GC. Uso de antagonistas de gnRH (Cetrorelix) en reproducción asistida: Primer informe en la literatura mexicana. *Ginec Obstet Mex* 2002;70:424-30.
12. Al Sebai MA, Diver M, Hipkin LJ. The role of a single free beta-human chorionic gonadotrophin measurement in the diagnosis of early pregnancy failure and the prognosis of fetal viability. *Hum Reprod* 1996;11:881-8.
13. Schmidt LL, Asch RH, Frederick JL. The predictive value of a single beta human chorionic gonadotrophin in pregnancies achieved by assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 1994;62:333-8.
14. Bjercke S, Tanbo T, Dale OP. Human chorionic gonadotrophin concentrations in early pregnancy after *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1999;14:1642-6.
15. Glatstein IZ, Homstein, Kahana MJ. The predictive value of discriminatory human chorionic gonadotrophin concentrations in the diagnosis of implantation outcome in *in vitro* fertilization cycles. *Fertil Steril* 1995;63:350-6.
16. Legro RS, Paulson RJ, Lobo RA. Association of early beta-human chorionic gonadotrophin values with pregnancy wastage and multiple implantation in a donor oocyte program. *Hum Reprod* 1995;10:3293-96.



Pronóstico del índice estradiol-óvulo en la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Dr. Pedro Galache Vega, Dr. Eric Saucedo de la Lata, Dr. Armando Treviño Rodríguez, Dr. Roberto Santos Haliscak, Dr. Víctor Alfonso Batiza Reséndiz, Dra. Lidia Arenas Montezco, Dra. María Rosa Moraga Sánchez, Dr. José Sepúlveda González, Dr. Manuel Leal Almeida, Dr. Jorge Rodríguez Pezino, Dr. Genaro García Villafañá, Dr. Samuel Hernández Ayup S.

Resumen

Objetivo. Analizar el índice de gestación de mujeres que ingresan a un programa de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), dependiendo del índice estradiol-óvulo. **Estudio.** Retrospectivo, comparativo. **Material y métodos.** Se incluyeron 332 pacientes que se dividieron en tres grupos dependiendo del índice estradiol/óvulo: Grupo A: < 100 pg/mL, grupo B: 101-250 pg/mL y grupo C > 250 pg/mL. **Protocolo terapéutico.** Supresión hipofisiaria con acetato de leuprolide en protocolo intermedio, HOC con FSHr y/o HMG, aplicación de GCH con más de tres folículos mayores de 18 mm, aspiración ovular 34 horas después. **Análisis.** de la edad de las pacientes, número de óvulos metafase II obtenidos, índice estradiol-óvulo, óvulos fertilizados, embriones transferidos, calidad y catéter de la transferencia embrionaria, y tipo de suplementación lútea. Análisis estadístico (SPSS 11) con chi al cuadrado, ANOVA y Kruskal-Wallis. **Resultados.** los mejores resultados del análisis de la cantidad de óvulos metafase II, óvulos fertilizados y número de embriones transferidos entre los tres grupos, fueron en el grupo B comparados con el grupo A y C, con diferencias significativas ($p = 0.014$, $p = 0.005$ y $p = 0.00$, respectivamente). Se analizó el índice estradiol-óvulo y los índices de gestación fueron muy diferentes entre los grupos (21.83, 36.62 y 17.80%) con una diferencia significativa ($p = 0.003$). **Conclusión:** Es conveniente vigilar las concentraciones séricas de estradiol ofreciendo esquemas de hiperestimulación ovárica menos agresivos para mejorar la calidad ovular. El índice estradiol-óvulo es un parámetro adecuado para cuantificar dicha respuesta, estableciéndose como valor predictivo de embarazo. ◇

Palabras clave: Gestación, índice estradiol-óvulo, inyección intracitoplasmática de espermatozoides. (Galache Vega P, et al. Pronóstico del índice estradiol-óvulo en la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Ginec Obst Mex 2003;71:600-604).

Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, NL.

54 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Tercer lugar de Investigación Clínica

Objectives. To analyze the pregnancy rate in women who underwent Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) program depending of the oestradiol/oocyte index. **Study design.** Retrospective, comparative. **Material and methods.** 332 patients were included. There were divided in three groups depending on the oestradiol/oocyte index: Group A:(100 pg/mL, group B: 101-250 pg/mL and group C: > 250 pg/mL). **Therapeutic protocol.** Down regulation with leuprolide acetate in late luteal phase protocol, COH with rec-FSH and / or HMG, ultrasonographic and estradiol blood levels were monitored; hCG application when >3 follicles >18 mm, oocyte retrieval performed 34 hours later. We analyzed: patient age, male age, number of follicles, estradiol serum levels at the day of hCG application, number of mature oocytes, oestradiol/oocyte index, fertilization rate, transferred embryos, transfer quality, catheter type and luteal support. Statistical analysis (SPSS 11) with chi square, ANOVA and Kruskal-Wallis was used. **Results.** On having analyzed the number of metaphase II oocytes retrieval, oocytes fertilized and number of transferred embryos among three groups, the best results were obtained in group B. The differences among these variables were significant. ($P = 0.014$, $p = 0.005$ and $p = 0.003$, respectively). When the oestradiol/oocyte index was analyzed and the PR among groups (21.83, 36.62 and 17.80 %) we observed a significant difference ($p = 0.003$). **Conclusion.** It is convenient to monitor the oestradiol blood levels to offer schemes of COH less aggressive to improve the oocyte quality. The oestradiol/oocyte index is a parameter adapted as a predictive value of pregnancy. ◇

Key words: Pregnancy, oestradiol/oocyte rate, intracytoplasmic sperm injection.

(Galache Vega P, et al. Prognostic values of oestradiol/oocyte rate in ICSI patients. Ginec Obst Mex 2003;71:600-604).

Introducción

La hiperestimulación ovárica que se realiza en mujeres que ingresan a programas de reproducción asistida incrementa las cifras séricas de estradiol a concentraciones suprafisiológicas. Distintos autores en el mundo han ofrecido conclusiones discordantes respecto al efecto de las altas concentraciones de estradiol en relación con el pronóstico reproductivo de estas pacientes.¹⁻⁷

Las altas concentraciones séricas de estradiol pueden ocasionar efectos deletéreos en el endometrio y con ello alterar los índices de gestación.⁴⁻⁷

Una manera más estricta de cuantificar el efecto del estradiol podría ser el índice estradiol-folículo o estradiol-óvulo, como lo menciona Yang, en Taiwan; sin embargo, existen pocos reportes que refieran dicho índice.⁴

Es necesario realizar más estudios que cuantifiquen el efecto de las altas concentraciones de estradiol con respecto a los índices de gestación de pacientes que acuden a programas de reproducción asistida.

Objetivo

Analizar el índice de gestación de mujeres que ingresan a un programa de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) dependiendo del índice estradiol-óvulo.

Se analizaron retrospectivamente 332 pacientes a quienes se realizó ICSI entre el 1 de enero del 2000 al 31 diciembre del 2001 en el Instituto para el Estudio de la Concepción Humana (IECH) de Monterrey, NL. Se dividió a las pacientes en tres grupos, dependiendo del índice estradiol-óvulo, determinándose la concentración de estradiol el día de la aplicación de la gonadotrofina coriónica humana (GCH): grupo A: < 100 pg/mL, grupo B: 101-250 pg/mL y grupo C > 250 pg/mL.

Todas las pacientes siguieron el mismo esquema de tratamiento: supresión hipofisiaria con un análogo de GnRH (acetato de leuprolide en un protocolo intermedio que se inició el día 21 del ciclo previo a la dosis de 0.05 mg y suspendiéndolo el día de la aplicación de la GCH), hiperestimulación ovárica con FSHr sola (Go-

nal F) o añadiendo menotropinas (HMG, Pergonal) a dosis individualizadas para cada paciente, se realizó monitoreo ultrasonográfico y determinaciones séricas seriadas de estradiol hasta detectar cuando menos tres folículos mayores de 18 mm, momento en el que se decidió la aplicación de 10,000 UI de GCH (Profasi) para realizar la aspiración ovular 34 horas después. Se efectuó la transferencia en el día 3 ó 5, dependiendo de la calidad embrionaria de cada paciente, se realizó suplementación lútea con progesterona intramuscular o vaginal y en caso de amenorrea 15 días después se determinó la prueba inmunológica de embarazo.

Se analizaron retrospectivamente las siguientes variables entre los tres grupos: edad de las pacientes, edad del varón, número de folículos, concentraciones séricas de estradiol el día de la aplicación de la GCH, número de óvulos metafase II obtenidos, índice estradiol-folículo, óvulos fertilizados, embriones transferidos, calidad de la transferencia embrionaria, catéter utilizado durante la transferencia y tipo de suplementación lútea.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 11. Se compararon las variables cualitativas con chi al cuadrado y las cuantitativas con ANOVA (paramétricas) y Kruskal-Wallis (no paramétricas).

Resultados

Se analizaron las características generales de las pacientes que ingresaron al estudio y se compararon entre sí según los grupos formados y previamente descritos, dependiendo del índice estradiol-óvulo. La edad media de las pacientes fue mayor en el grupo con índice menor a 100 pg/mL (33.23 ± 4.4) que en el grupo con índice mayor a 250 pg/mL (32.3 ± 4.26); sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.387$). Tampoco existió diferencia significativa

en las siguientes variables: edad del varón ($p = 0.504$), tipo de catéter utilizado durante la transferencia embrionaria ($p = 0.304$), calidad de la transferencia ($p = 0.069$) y tipo de suplementación lútea ($p = 0.550$) (Cuadro I).

Al comparar entre los grupos la concentración de estradiol sérico determinada el día de la aplicación de la GCH, se encontró una diferencia significativa, que fue mayor en el grupo con índice estradiol-óvulo mayor de 250 pg/mL (2921 ± 2567) que en los grupos con índices menores a 100 pg/mL y 101-250 pg/mL (537 ± 455 y 1560 ± 1140 , respectivamente) ($p < 0.001$). Aunque el grupo en el que mayor cantidad de folículos se encontraron fue el B (11.11 ± 6.2), al compararse con los grupos A y C (9.24 ± 6.2 y 10.6 ± 6.9) la diferencia no logró significado estadístico ($p = 0.09$) (Cuadro I).

En el análisis de la cantidad de óvulos metafase II, óvulos fertilizados y número de embriones transferidos entre los tres grupos, encontramos que los mejores resultados se obtuvieron en el grupo B (9.6 ± 6.2 , 5.2 ± 5.3 , 2.99 ± 0.84 , respectivamente) al compararlos con el grupo A (8.5 ± 5.7 , 4.5 ± 3.02 , 2.7 ± 1.0), y el grupo C (7.23 ± 5.84 , 3.8 ± 2.7 , 2.5 ± 1.0). Las diferencias de estas variables fueron estadísticamente significativas ($p = 0.014$, $p = 0.005$ y $p = 0.003$, respectivamente). Al comparar entre sí los grupos respecto a la cantidad de óvulos metafase II obtenidos, la diferencia observada entre el grupo A y B no fue significativa ($p = 0.153$), tampoco la comparación entre los grupos A y C ($p = 0.178$); sin embargo, la diferencia entre el grupo E y el C fue significativa ($p = 0.004$), mayor para el grupo con menor índice estradiol-óvulo (Cuadro I).

Se compararon inicialmente los índices estradiol-folículo conformando tres grupos con igual designación que para los índices estradiol-óvulo (< 100 pg/mL, 101-250 pg/mL y > 250 pg/mL), encontrándose índices de gestación de 26.9, 29.9 y 27.02 % respec-

CUADRO I. Características de los grupos dependiendo del índice estradiol/óvulo

	Grupo A (< 100 pg/mL)	Grupo B (101-250 pg/mL)	Grupo C (> 250 pg/mL)	p
Edad	33.2 ± 4.4	32.8 ± 4.6	32.3 ± 4.2	0.387
Edad varón	35.9 ± 5.8	36.0 ± 6.0	34.0 ± 7.6	0.504
Folículos	9.24 ± 6.2	11.11 ± 6.2	10.6 ± 6.9	0.090
Estradiol d10	537 ± 455	1560 ± 1140	2921 ± 2567	< 0.001
OvulosMII	8.5 ± 5.7	9.6 ± 6.2	7.23 ± 5.8	0.014
Estradiol/folículo	64.6 ± 51.2	144.7 ± 83.6	307.7 ± 346.3	< 0.001
Fertilizados	4.5 ± 3.0	5.2 ± 5.3	3.8 ± 2.7	0.005
Embriones transferidos	2.7 ± 1.0	2.9 ± 0.84	2.5 ± 1.0	0.003

CUADRO II. Índice de gestación dependiendo del índice estradiol/óvulo

Estradiol/óvulo	Pacientes	Embarazos	Índice de gestación
< 100 pg/mL	87	19	21.8%
101-250 pg/mL	172	63	36.6%
> 250 pg/mL	73	13	17.8%

$p = 0.003$

tivamente ($p = 0.831$); luego se realizó el mismo análisis con el índice estradiol-óvulo y los índices de gestación fueron muy diferentes entre los grupos (21.83, 36.62 y 17.80 %), con diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.003$) (Cuadro II).

Discusión

El efecto que pueden ejercer altas concentraciones de estradiol consecutivas a los esquemas de hiperestimulación ovárica utilizados en reproducción asistida aún es un tema de debate en la literatura mundial. Existen autores que defienden la idea de que las altas concentraciones séricas hormonales no son deletéreas para el pronóstico reproductivo de las pacientes;¹⁻³ sin embargo, algunos otros han demostrado clínicamente el efecto adverso en la receptividad endometrial.⁵⁻⁷ Existe un trabajo que apoya esta última hipótesis, pero tomando en cuenta el índice estradiol-óvulo en mujeres a quienes se realizó transferencia intratubárica de gametos.⁴

En este estudio retrospectivo, analítico, realizado en 332 mujeres a quienes se hizo ICSI en un periodo de dos años, se demuestra que un índice estradiol-óvulo mayor a 250 pg/mL es deletéreo para los índices de gestación y que las pacientes con mejor pronóstico son aquellas con una relación estradiol-óvulo que se sitúa entre 100 y 250 pg/mL.

A pesar de las altas concentraciones de estradiol, el grupo con mayor índice estradiol-folículo tuvo menor cantidad de óvulos metafase II que fertilizaron en

menor grado y que finalmente lograron menor número de embriones para transferir. Por lo tanto, puede establecerse la hipótesis de que las altas concentraciones de estradiol podrían incrementar las concentraciones intrafoliculares de la hormona y esto afectaría la calidad de los óvulos y los embriones y, posteriormente, el pronóstico reproductivo de las pacientes que ingresan a programas de reproducción asistida. Es necesario, además, investigar el efecto que puede ejercer la concentración suprafisiológica de estradiol en el endometrio.

Es conveniente vigilar las concentraciones séricas de estradiol con esquemas de hiperestimulación ovárica menos agresivos para mejorar la calidad ovular y, con ello, el resultado de las pacientes; lo anterior se ha probado previamente al utilizar un régimen step-down en altas respondedoras en quienes han mejorado la receptividad uterina y los resultados clínicos.⁸

Conclusión

En las mujeres que ingresan a programas de reproducción asistida debe ser una finalidad la utilización de esquemas de inducción de ovulación que logren concentraciones séricas de estradiol adecuadas. El índice estradiol-óvulo es un parámetro adecuado para cuantificar dicha respuesta, estableciéndose como un valor predictivo de embarazo. ◇

Referencias

- Chenette PE, Sauer MV, Paulson RJ. Very high serum oestradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;54:858-63.
- Sharara FI, McClamorck HD. High estradiol levels and high oocyte yield are not detrimental to in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1999;72:401-5.
- Yu Ng EH, Yeung WS, Yee Lan LE, et al. High serum oestradiol concentrations in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum Reprod* 2000;15:250-55.
- Yang JH, Chen HF, Lien YR, et al. Elevated E2: oocyte ratio in women undergoing IVF and tubal ET. Correlation with a decrease in the implantation rate. *J Reprod Med* 2001;46:434-8.
- Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA. Embryo implantation after human *in vitro* fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1990;53:870-74.

6. Simon C, Cano F, Balbuena D, *et al.* Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum oestradiol concentrations in high and normal responder patients. *Hum Reprod* 1995;10:2432-37.
7. Pellicer A, Valbuena D, Cano E, *et al.* Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril* 1996;65:1190-95.
8. Simon C, García Velasco JJ, Valbuena D, *et al.* Increasing uterine receptivity by decreasing estradiol levels during the preimplantation period in high responders with the use of a follicle-stimulating hormone step-down regimen. *Fertil Steril* 1998;70:234-39.



HACE 54 AÑOS

La sinfisiotomía de Zárate

Dr. José RABAGO¹
de México, D. F.

Artículo publicado en el Volumen IV, número 18-19, noviembre-diciembre de 1948, páginas 149-153.
El texto está reproducido respetando la versión original.

La pelvitomía es una operación que ha tenido varias etapas de estar en uso y en abandono. En el siglo XVIII, antes de la asepsia de la antisepsia, cuando la operación cesárea era mortífera al grado de que la mayoría de los parteros llegaron a considerarla como criminal, la invención de la sinfisiotomía por Sigault fue recibida con aplauso pues proporcionaba la oportunidad de obtener un feto vivo sin riesgo de muerte para la madre.

Al advenimiento de la antisepsia y de la anestesia, mejoró extraordinariamente el pronóstico de la operación cesárea, y la pelvitomía perdió terreno; pero sin embargo, el índice de mortalidad de la cesárea era elevado, sobre todo si se practicaba durante el trabajo de parto avanzado y después de maniobras vaginales. Entonces, a insistencias de MORISANI volvió a practicarse la pelvitomía: PINARD y FARABEUF en Francia estudiaron a fondo la sinfisiotomía; GIGLI inventó su hilo sierra para cortar el pubis; DODERLIN, inventó su aguja para la pubiotomía subcutánea a la que rebautizó con el nombre de Heboosteotomía.

Poco tiempo duró la moda de la pelvitomía, pues nuevos perfeccionamientos técnicos de la operación cesárea permitieron operar, con gran margen de seguridad, a las pacientes en trabajo de parto.

Al iniciarse el que habla en la cirugía obstétrica tan sólo se oía hablar en México de una que otra sinfisiotomía, practicada por parteros de las generaciones anteriores.

En los años de 1924 y 1925 ZÁRATE y PALACIOS ACOSTA, de Buenos Aires, en sendas comunicaciones a la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de París hicie-

ron conocer la técnica del primero de ellos, que es una modificación de la técnica de FRANCK; con la cual, decían los argentinos, que no se presentaban los accidentes y complicaciones que habían desacreditado a la sinfisiotomía de FARABEUF.

La sinfisiotomía de ZÁRATE ha sido llamada sinfisiotomía frenada o "Partialis", pues conserva a la sínfisis sus ligamentos anterior y superior y frena la separación de los cabos púbicos, por la distensión de las fibras aponeuróticas de los músculos oblicuos del abdomen que se entrecruzan en la línea media, suprapúbica y se insertan sobre el ligamento superior de la sínfisis.

De este modo, según ZÁRATE, la separación de los cabos púbicos no va más allá de tres o cuatro centímetros y esta separación no tiene influencia sobre las articulaciones sacroilíacas y no provoca la gran distensión de las partes blandas subpúbicas, que determinan los desgarros de vejiga y uretra, tan comunes en las antiguas sinfisiotomías.

ZÁRATE y algunos otros parteros pensaron que la sinfisiotomía había resuelto el problema del parto en las estenosis pélvicas relativas y aun creyeron que, dada la sencillez de su técnica, estaba al alcance del médico práctico; pero, como veremos más adelante, es tan difícil precisar su indicación que se necesita la experiencia del partero especializado. Sin embargo, se ha practicado ampliamente en las maternidades argentinas, viéndose que Peralta Ramos en el transcurso de dos años, de 1931 a 1933, la ejecutó 37 veces y existiendo estadísticas de 104 casos (Falsía) 50 casos, Ireata, etc.

¹Profesor de Obstetricia Clínica de la Universidad Nacional de México.

Pero viene de nuevo una mejoría en el pronóstico de la operación cesárea con el uso de la sulfamidoterapia intraperitoneal y la penicilina y desciende la importancia de la sinfisiotomía.

En Cuba, donde fue introducida por Eusebio HERNÁNDEZ y donde se usa habitualmente la técnica subcutánea de ORTIZ PÉREZ, también se van restringiendo sus indicaciones.

Para no mencionar más que a los exponentes más distinguidos de ambos países, transcribiré las más recientes opiniones de PERALTA RAMOS y RAMÍREZ OLIVELLA.

Dice Olivella:

“En estos últimos años los obstetras cubanos han restringido un tanto la práctica de la sinfisiotomía.

Es una operación a la cual no recurriremos deliberadamente y el partero frente a una desproporción céfalo-pelviana previamente reconocida, la resuelve casi siempre con miras a la operación cesárea.

Estimamos que la sinfisiotomía constituye un útilísimo recurso terapéutico, ocasionalmente en presencia de un síndrome de insuficiencia céfalo-pelviana hasta entonces ignorado en el que la hora de la operación cesárea sin riesgos para la madre, ha pasado. Aún queda la sinfisiotomía para salvar el feto que permanece vivo”.

Dice Peralta Ramos:

“Poca mención se hace en los últimos años de las pelvito-mías. Ciertamente es que estas operaciones, fuera de Alemania y América Latina, nunca tuvieron gran difusión en la mayoría de los países civilizados.

“La sinfisiotomía no ha satisfecho a la mayoría de los tocólogos no experimentados y médicos prácticos, incapaces de recurrir a ella, cuando deben proceder por su sola cuenta”.

“El procedimiento “per se” no les resulta atrayente”.

“Es que las pelvito-mías están rodeadas de escollos que acechan peligros de complicaciones inmediatas y de graves secuelas, cuando no se precisan con rigor las indicaciones, oportunidad y condiciones favorables, que sólo el especialista experimentado es capaz de valorar”.

Después de enumerar los progresos técnicos y farmacológicos que han mejorado el pronóstico de la cesárea, continúa Peralta:

“Esto se traducirá cada vez más en beneficio de la operación cesárea y en detrimento, por lo tanto, de la sinfisiotomía. Nada tendrá que hacer ya la sinfisiotomía en la distocia compleja. Poco o nada cuando de antemano se puede prever que después de la operación, el parto se deba

terminar artificialmente y aun cuando pueda terminar espontáneamente, se le practicará con mucha prudencia y reserva si la presentación céfálica está por encima del estrecho superior”.

“La sinfisiotomía resultará el mejor recurso, si las condiciones son favorables y la presentación céfálica se encuentra fuertemente apoyada y configurada, verdaderamente enclavada. Bastaría la sección de la sínfisis para que la cabeza encaje y descienda”.

Indicaciones:

Los lineamientos que hemos adoptado son los señalados por Manuel Luis PÉREZ en su tratado de Obstetricia.

Para que pueda tener éxito la sinfisiotomía como tratamiento de la distocia pélvica es necesario que se cumplan los siguientes requisitos:

1° - La estenosis debe ser moderada, es decir, que el acortamiento del diámetro promonto retropúbico no sea mayor de 2 cms. o 2 1/2, es decir, que dicho diámetro pase de 8 centímetros en las pelvis planas y 8 1/2 en las uniformemente estrechas.

Si la operación se practica con diámetros pélvicos más cortos sería necesaria una abertura de la sínfisis mayor de los cuatro centímetros que deben obtenerse con el método de ZÁRATE; y entonces al abrirse más la sínfisis vendrán las complicaciones de lesión de las articulaciones sacroilíacas o de los órganos retropúbicos, convirtiéndose la sinfisiotomía *frenada* en una sinfisiotomía *desenfrenada*, como dice graciosamente RAMÍREZ OLIVELLA.

2° - Que el canal blando del parto no presente obstáculos a la progresión del feto. Por lo tanto, la dilatación del cuello debe ser completa o *fácilmente* completable. Asimismo la vagina y el perineo deben ser elásticos y en caso contrario se seccionan ampliamente con episiotomía y aún con la incisión para-vaginal de SCHUCARDT.

Con respecto al grado de dilatación existe discrepancia entre los parteros cubanos y los argentinos; pues aquéllos consideran que la sinfisiotomía puede hacerse antes de la dilatación completa, pues “precisamente en los casos de rotura prematura o precoz de las membranas, con síndrome de insuficiencia cefalopelviana, la dilatación permanece estacionada cuando la distocia se prolonga y el orificio uterino se torna grueso y edematoso; una vez seccionada la sínfisis, la cabeza desciende, el edema desaparece y el orificio uterino se dilata” (OLIVELLA).

3° - Que la potencia del motor uterino esté conservada, con objeto de lograr el parto por la acción sola de la contracción y sin recurrir a maniobras.

4° - Que el feto esté vivo; de lo contrario no cabe la sinfisiotomía sino la basiotripsia.

Si nos ajustamos *estrictamente* a estas condiciones, veremos que es difícil encontrarlas reunidas, pues cuando en un parto la cabeza fetal no va descendiendo hacia la excavación pélvica, la dilatación del cuello es lenta y muchas veces no pasa de 4 a 5 centímetros y de ahí en adelante hay tendencia a la rigidez del cuello por infiltración serosanguinolenta.

Por otra parte, el músculo uterino en su lucha contra el obstáculo óseo tiene *tendencia* a la contractura o a la *inercia*.

Para comprobación de lo asentado vemos que en los años de 1938 a 1940, se atendieron en la Maternidad del Hospital General de Mexico, 11,596 partos y entre esta cifra hubo 43 casos de desproporción cefalopélvica que se resolvieron quirúrgicamente: 39 por cesárea y 4 por sinfisiotomía; de ello resulta que se practicaron aproximadamente una sinfisiotomía por cada 9 cesáreas.

La estenosis pélvica ha dado motivo a la operación cesárea en un caso sobre 294 y que, la sinfisiotomía se ha practicado en un caso sobre 2898. Además de los casos de estenosis pélvica, la sinfisiotomía encuentra indicaciones en los casos de exceso de volumen de la cabeza fetal consecutivo, ya sea a desarrollo excesivo del feto, ya sea a una actitud anormal de la cabeza como en las presentaciones de frente o de sincipicio.

La han practicado algunos parteros en partos pélvicos, en los que la cabeza última no ha podido franquear el estrecho superior.

Técnica Operatoria

A continuación damos la técnica de la sinfisiotomía de ZÁRATE.

1. - Antisepsia de la región del pubis, y porción anterior del abdomen y órganos genitales externos.
2. - Anestesia que puede ser general o local. ZÁRATE prefiere la anestesia general. Nosotros no hemos ensayado la local.
3. - Dos ayudantes mantienen a la enferma con la pelvis a la orilla de la mesa obstétrica y los miembros inferiores flexionados fuertemente hacia el abdomen y en abducción forzada. OLIVELLA prefiere mantener los miembros inferiores sostenidos por los portapiernas usuales de la mesa obstétrica.
4. - Se sondea la vejiga dejando la sonda puesta para percibir fácilmente la uretra.
5. - Se introducen los dedos de la mano izquierda en la vagina, los cuales desviarán hacia un lado la uretra y tomarán contacto con la cara posterior de la sínfisis.

6. - Con un bisturí de hoja fija y con su porción cortante como de 5 centímetros de longitud se puncionará perpendicularmente la región púbica a 5 milímetros abajo del borde superior de la sínfisis, hasta encontrar el fibro cartílago articular al cual perfora hasta que la punta del cuchillo es percibida por los dedos vaginales.

7. - Entonces se le imprimen al cuchillo pequeños movimientos de vaivén, al mismo tiempo que se va levantando el mango del cuchillo hasta que quede casi horizontal sobre el abdomen. Con esto se logra seccionar todo el fibro cartílago y se llega al ligamento subpubiano, que se identifica por su mayor resistencia al corte.

Lentamente se va seccionando a este ligamento y al romperse sus últimas fibras se percibe un crugido que indica que la articulación se ha abierto. Si no se abre la sínfisis, es señal de que quedó en el borde superior de ella un poco de fibrocartílago por seccionar y entonces se extrae en parte el cuchillo, llevándose la punta hacia el borde superior de la sínfisis para cortar la porción de fibro-cartílago y de ligamento superior que impide la diastasis sinfisaria.

8. - Los dedos vaginales se dan cuenta de la separación, pues uno de ellos puede insinuarse entre los cabos púbicos. Entre ellos y el pulgar de la misma mano que ha quedado afuera, se comprime la sínfisis para expulsar la sangre que se ha colectado.

9. - Se pone un punto de sutura en la pequeña herida que ha causado el bisturí.

10. - Se aplica una inyección de pituitrina que restaura las contracciones uterinas debilitadas por la anestesia y gracias a las cuales se verificará el parto.

Casuística

El que esto escribe ha practicado hasta la fecha 24 sinfisiotomías con la técnica de Zárate.

De ellas fueron 17 en múltiparas y 7 en primíparas; o sea 70 y 30 %, respectivamente.

El modo de terminación del parto fue como sigue:

Espontáneo tras aplicación de pituitrina ...	18	75 %
Con maniobra de Kristeller.....	4	16.6 %
Con aplicación de fórceps	2	8.4 %

El tiempo transcurrido entre el momento de la sección de la sínfisis y el de la salida del feto varió entre 5 minutos y una hora, siendo el promedio de 20 minutos.

Se anotaron 8 casos con secuelas febriles o sea 33 %; entre los cuales 2 fueron de tipo septicémico. Esta elevada cifra de morbilidad puerperal demuestra que, de haberse practicado la cesárea, se hubiera hecho correr un riesgo grave a las pacientes.

En un caso de los que requirieron aplicación de fórceps hubo diastasis de las articulaciones sacro-ilíacas, que inmovilizó a la enferma por tres meses; pero que a la postre no dejó secuelas permanentes.

En otros tres casos las enfermas se quejaron, al levantarse, de dolores púbicos o sacro ilíacos pero que sedieron rápidamente.

Hubo un caso, en primípara, con desgarro de la pared anterior de la vagina y desprendimiento de la uretra; pero, una vez desinfectado cicatrizó sin dejar trastornos en la función de la micción.

Debo mencionar un caso de muerte. Se trató de una enferma que ingresó con ataques de eclampsia y que falleció de congestión pulmonar. Por lo tanto, no puede atribuirse su muerte a la intervención.

El tiempo de hospitalización de las enfermas varió entre 14 y 36 días, exceptuando a la enferma de la dias-

tasis de las articulaciones sacro-ilíacas ya mencionada. El promedio de estancias fue de 24 días.

19 casos pertenecen al servicio de Maternidad del Hospital General. Los tres primeros casos fueron operados en la Maternidad de las Lomas de Chapultepec. Dos casos pertenecen a mi clientela privada.

Comentarios:

- 1° - La sinfisiotomía es una operación que tiene indicaciones excepcionales.
- 2° - Cuando dichas indicaciones se cumplen es una operación inocua y de resultados espectaculares.
- 3° - En la primípara hay que ser muy cautos para proceder a ejecutarla, pues es en ella donde pueden presentarse de preferencia los accidentes y complicaciones.
- 4° - El conocimiento de la técnica de ZÁRATE es útil, pues en ocasiones permite resolver satisfactoriamente casos de desproporción céfalo-pélvica en que no quedaría otro recurso que la cesárea seguida de histerectomía. ◇



Instrucciones para los autores

Ginecología y Obstetricia de México (Ginec Obstet Mex) es el órgano oficial de la Federación Mexicana de Ginecología y Obstetricia, aparecen 12 números al año y un suplemento. Se publica en español, con resúmenes en inglés. Ginecología y Obstetricia de México publica trabajos originales, casos clínicos, cartas al editor, editoriales, comentarios de libros publicados e información sobre actividades académicas, relacionados con temas relevantes de la Ginecología y Obstetricia.

Los manuscritos deben prepararse de acuerdo con los Requisitos Uniformes para los Manuscritos Enviados a Revistas Biomédicas, desarrollados por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, cuyas versiones más recientes se publican (en español) en Ginecología y Obstetricia de México (febrero y septiembre de 2003).

El envío del manuscrito implica que es un trabajo no publicado, excepto como resumen, y que no será enviado simultáneamente a ninguna otra revista. Los manuscritos aceptados para su publicación, serán propiedad de Ginecología y Obstetricia de México y no podrán ser publicados (ni completos ni parcialmente) en ninguna otra parte, sin consentimiento escrito del editor y señalando el crédito respectivo. Los manuscritos no serán devueltos, por lo que se recomienda que el autor conserve una copia completa.

Ginecología y Obstetricia de México somete los artículos recibidos al proceso de revisión por pares abierta, por lo que cada trabajo es revisado al menos por dos árbitros experimentados.

Para la preparación de manuscritos, se ha integrado una lista de cotejo que el autor deberá seguir puntualmente antes de enviar su trabajo (Página 546). Ginecología y Obstetricia de México se reserva el derecho de hacer las modificaciones que considere pertinentes de acuerdo con su línea editorial. Los manuscritos que no se apeguen a estos lineamientos, serán rechazados y se devolverán al autor.

El manuscrito deberá ir acompañado de la cesión de derechos de autor, que se incluye en la página 548 (Favor de fotocopiarla y anexarla al manuscrito).

Lista de cotejo para los autores

Por favor, marque con una cruz cada apartado que vaya cubriendo los requisitos especificados.

Preparación general del manuscrito

- ☐ Preparar original y tres copias completas, escritas a doble espacio, en papel blanco, tamaño carta, con márgenes de 2.5 cm. Usar letra Arial, tamaño 11. Acompañar el manuscrito de la versión electrónica en disquete o en CD. Todas las hojas irán numeradas, de preferencia en el ángulo superior derecho. La extensión final del manuscrito debe ser de 10 a 20 cuartillas más cuadros y figuras.
- ☐ Cada sección del manuscrito irá en hoja separada: título, resúmenes, artículo (estructurado según el tipo de trabajo), referencias, cuadros, figuras (con sus respectivos pies).
- ☐ Las fotografías serán originales, acompañadas de una copia tamaño carta. En caso de enviarlas en archivo electrónico, deberán ser en formato tif, a 300 dpi, en disquete o CD independiente del archivo de texto general del trabajo.

Tipo de publicaciones

Ginecología y Obstetricia de México publica cuatro categorías de trabajo:

1. Investigación básica
2. Investigación clínica
3. Revisión temática
4. Caso clínico

Secciones

Título

- ☐ **Título completo.** Limitado a un renglón, no utilizar abreviaciones (en español y en inglés).
- ☐ **Título corto.** Para cornisas, limitado a la tercera parte de un renglón (o 45 caracteres).
- ☐ **Autores.** Nombre completo y apellidos de todos los autores. Adscripción de los autores. Lugar donde fue realizado el trabajo. Se consideran autores quienes contribuyeron al diseño del estudio, análisis de datos y redacción del manuscrito.
- ☐ **Abreviaturas.** Utilizar las de aceptación universal. En caso de recurrir a abreviaturas no convencionales, se incluirán en una lista, en orden alfabético.

Resúmenes

- ☐ **Resumen en español,** 200 a 250 palabras. Si el trabajo se presta al formato estructurado deberá ir en la secuencia de: objetivos, material (o pacientes) y método, resultados y conclusiones. En el resumen no se emplearán abreviaturas ni se citarán referencias. Incluirá de tres a diez palabras clave, siguiendo la nomenclatura del MESH.
- ☐ **Abstract** (Resumen en inglés). Con las mismas características del resumen en español (incluyendo palabras clave en inglés). Los trabajos que no incluyan *Abstract*, serán devueltos, sin revisión.

Texto

- ☐ Estructurado de acuerdo con las características del trabajo: introducción, objetivo, material y método, resultados, comentario, conclusiones, referencias bibliográficas.
- ☐ Describir los métodos estadísticos utilizados.
- ☐ Los fármacos y químicos deberán citarse por su nombre genérico.

Referencias bibliográficas

Las referencias no excederán de 10 y deberán incluir trabajos publicados en **Ginecología y Obstetricia de México**.

- ☐ Citar las referencias en la secuencia en que aparecen en el texto, utilizando números arábigos entre paréntesis, colocados después del signo ortográfico que corresponda (es decir, después de coma, punto y coma o punto). Las comunicaciones personales y los datos que aún no se han publicado se mencionarán en el cuerpo del texto, pero no se incluirán como referencias.
- ☐ Las abreviaturas de las publicaciones serán las que utiliza el *Index Medicus*.

Ejemplos

Artículos en revistas

Hernández M, Cuéllar Estrada J, Levario Carrillo M. Corioangioma gigante de la placenta: Informe de un caso. *Ginec Obstet Mex* 2001; 69: 439-42.

Libros

Velásquez Jones L. Redacción del escrito médico. 4a. edición. México: Ediciones médicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez; 1999. p. 109.

Capítulos en libros

Velásquez Jones L. Referencias. En Velásquez Jones L. Redacción del escrito médico. 4a. edición. México: Ediciones médicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez; 1999. p. 97-116.

Cuadros y figuras

- ☐ Cada uno en hoja separada, numerados según el orden en que aparecen en el texto.

Contribución de los autores

Junto con el manuscrito, el autor principal deberá describir, en una página por separado, la participación de cada uno de los autores (delante del nombre de cada colaborador, anotar el o los números que describan su contribución. Ejemplo: Dr. Alfonso Álvarez 1, 2, 6).

1. Conceptualización y diseño
2. Adquisición de una parte importante de datos
3. Análisis e interpretación de datos
4. Redacción del manuscrito
5. Revisión crítica del manuscrito
6. Asesoría estadística
7. Dar fundamento al proyecto o estudio
8. Supervisión (responsabilidad de todos los aspectos del proyecto o estudio)
9. Otras (especifique) _____

Lo anterior será publicado al final de cada artículo como *Contribución de los autores*.

Envío

Datos personales del primer autor: Nombre, cargo, domicilio, teléfono, correo electrónico y fax.

Todos los manuscritos deberán ser enviados a:

Revista Ginecología y Obstetricia de México

Calle de Nueva York Número 38
Colonia Nápoles. México, D.F.
C.P. 03810. MÉXICO

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

➡ TÍTULO DEL ARTÍCULO: _____

➡ NOMBRE COMPLETO DEL AUTOR O AUTORES: _____

➡ LOS AUTORES CERTIFICAN QUE SE TRATA DE UN TRABAJO ORIGINAL, QUE NO HA SIDO PREVIAMENTE PUBLICADO NI ENVIADO PARA SU PUBLICACIÓN A OTRA REVISTA. MANIFIESTAN QUE NO EXISTE CONFLICTO DE INTERESES CON OTRAS INSTANCIAS.

➡ TAMBIÉN ACEPTAN QUE, EN CASO DE SER ACEPTADO PARA PUBLICACIÓN EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO, LOS DERECHOS DE AUTOR SERÁN TRANSFERIDOS A LA REVISTA.

➡ NOMBRE Y FIRMA DE TODOS LOS AUTORES:	NOMBRE	FIRMA
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

➡ VISTO BUENO (NOMBRE Y FIRMA) DE AUTORIZACIÓN DE LA INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO:

NOMBRE	FIRMA
_____	_____
_____	_____
_____	_____

➡ LUGAR: _____ FECHA: _____