



EDITADA POR LA
FEDERACIÓN MEXICANA
DE GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA

FUNDADA
POR LA ASOCIACIÓN
MEXICANA
DE LA GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA EN 1945

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. Carlos Espinosa Flores
Dr. Samuel Karchmer K.
Dr. Efraín Vázquez Benítez
Dr. José Roberto Ahued Ahued
Dr. José Antonio Sereno Coló

Dra. Judith Ablanedo Aguirre	Dra. Teresita Leis Márquez
Dr. Alberto Alvarado Durán	Dr. Victoriano Llaca Rodríguez
Dr. Carlos Aranda Flores	Dr. Mario López Llera
Dr. Aquiles R. Ayala Ruíz	Dr. Miguel Ángel Mancera Reséndiz
Dr. Luis Alberto Barrera González	Dr. Reynaldo Milla Villeda
(Mérida, Yuc.)	(Durango, Dgo.)
Dr. Antonio de Jesús Briseño Sainz	Dr. José de Jesús Montoya Romero
(San Luis Potosí)	(Mazatlán, Sin.)
Dr. Juan Antonio Bujaidar Bujaidar	Dr. Alfonso Murillo Uribe
(Durango, Dgo.)	Dr. José Pereira Carcaño
Dr. Héctor Hugo Bustos López	(Mérida, Yuc.)
Dr. Francisco Cabral Castañeda	Dr. Jesús Puente Tovar
Dr. Paolo Di Castro Stringher	(Monterrey, N.L.)
Dr. Guillermo Díaz Barreiro	Dr. Carlos Quesnel García-Benítez
Dr. Julio Fernández Alba	Dr. Gilberto Ramírez Cueto
Dr. Oscar Flores Carreras	Dr. Alfonso Ríos Montiel
(Guadalajara, Jal.)	Dr. Francisco Ruiloba Madero
Dr. Luis Manuel Flores Frías	(Aguascalientes, Ags.)
(Xalapa, Ver.)	Dr. José Antonio Ruíz Moreno
Dr. Angel García Alonso	Dr. Carlos Salazar López Ortiz
Dr. Salvador Gaviño Ambríz	Dr. Carlos Sánchez Basurto
Dr. Fernando Gaviño Gaviño	Dr. Guillermo Santibáñez Moreno
Dr. Fco. Javier Gómezpedroso Rea	Dr. Claudio Serviere Zaragoza
Dra. Patricia Grether González	Dr. Luis Simón Pereira
Dr. Samuel Hernández Ayup	Dr. Gilberto Tena Alavez
(Monterrey, N.L.)	Dr. Rubén Tlapanco Barba
Dra. Ma. de la Paz Hernández Cruz	Dr. Bernardo Torres del Toro
(Querétaro, Qro.)	Dr. Armando Torres Ramírez
Dr. Francisco Ibargüengoitia Ochoa	Dr. Cesar Trejo Ramírez
Dr. Sebastián Iris de la Cruz	Dr. Roberto Uribe Elías
Dr. Alberto Kably Ambe	Dr. Luis Carlos Uribe Ramírez
Dr. Jorge Kunhardt Rasch	(Guadalajara, Jal.)
Dr. Jesús Leal del Rosal	Dr. José Edmundo Valdés Macho
(Chihuahua, Chih.)	Dr. Manuel Villalobos Román
	Dr. Carlos Villanueva Díaz



Agrupaciones Federadas

Asociación Mexicana de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Monterrey
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Yucatán, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Guadalajara
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de "La Laguna"
Sociedad Potosina de Ginecología y Obstetricia
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de León, A.C.
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Tampico y Ciudad Madero
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Tijuana, A.C.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Mexicali
Asociación Sinaloense de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Asociación Chihuahuense de Ginecología y Obstetricia
Colegio de Ginecólogos y Obstetras de Puebla
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
Asociación Tabasqueña de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad Oaxaqueña de Ginecología y Obstetricia, A.C.
Sociedad Xalapeña de Ginecología y Obstetricia
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Aguascalientes, A.C.
Sociedad 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
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
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
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Querétaro
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
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.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Ciudad Obregón
Sociedad de Ginecología y Obstetricia del Mayo
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Matamoros
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Quintana Roo
Asociación de Ginecología y Obstetricia de San Luis Río Colorado, Son.
Asociación de Ginecología y Obstetricia de Morelos, A.C.
Asociación Vallartense de Ginecología y Obstetricia
Asociación de Ginecología y Obstetricia de la Costa de Chiapas
Sociedad de Ginecología y Obstetricia de Zacatecas
Asociación Sudcaliforniana de Ginecología y Obstetricia
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
Asociación de Ginecoobstetras Guasave-Guamúchil, A.C.
Sociedad Cuauhtemense de Ginecología y Obstetricia
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
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.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Delicias, A.C.
Colegio de Ginecología y Obstetricia de Uruapan, A.C.
Colegio Gineco-Obstétrico de Tehuacán, A.C.
Colegio Gineco-Obstétrico de la Cuenca del Papaloapan, A.C.
Colegio Gineco-Obstétrico 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.



1 Editorial

Artículos originales. Investigación básica

5 Gestaciones en ovejas autotrasplantadas con tejido ovárico criopreservado: evidencia de viabilidad ovocitaria posterior al proceso de congelación y trasplante

Antonio Gutiérrez Gutiérrez, Marco Antonio Vargas Aguirre, Angélica Corona, Martha Echeverri Becerra, Claudia González Ortega, Sergio Mendoza Hurtado, Edith Monroy Avendaño, Guillermo Tovar Caballero

Los objetivos de este estudio experimental y prospectivo fueron evaluar la viabilidad del tejido ovárico después de congelación y autotrasplante en ocho ovejas. Se consiguió retorno de actividad ovulatoria en siete de ocho ovejas autotrasplantadas (87.5%) en un tiempo promedio de 62.8 ± 9.1 días evidenciado por niveles séricos de progesterona. Se concluyó que el presente estudio nos demuestra una adecuada restauración de la función ovárica en ovejas ooforectomizadas con autotrasplante de tejido ovárico y las primeras gestaciones logradas por esta técnica en Latinoamérica. Es posible suponer que estos resultados son reproducibles en mujeres.

12 Factores de riesgo para cáncer cervicouterino por IVPH: polimorfismo del codón 72 del gen oncosupresor p53 en mujeres que acuden a atención hospitalaria

Dr. A. Sifuentes Álvarez, Dr. Miguel Reyes Romero

El objetivo de este trabajo fue determinar en una muestra de mujeres la frecuencia de alelos y genotipos prolina-arginina del codón 72 del gen p53. El estudio se realizó en mujeres que ingresaron a atención médica hospitalaria. Se concluye que la determinación de este tipo de polimorfismos es importante como medida preventiva dentro de la identificación de factores de riesgo para CaCu asociado a infección por VPH.

Artículos originales. Investigación clínica

16 Análisis de la proporción en la tasa de fertilización como una variable predictiva del éxito en un programa de fertilización in vitro

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dr. José Antonio Garzón Núñez, Dr. Everardo Anta Jaen, Dra. Esperanza Carballo Mondragón

Este estudio retrospectivo, observacional y descriptivo se realizó para determinar si las tasas de fertilización pueden ser utilizadas como un factor predictivo para la consecución de embarazo en programas de FIVTE-ICSI. Los resultados permiten concluir que el porcentaje de fertilización mayor a 50% puede ser utilizado como un factor pronóstico para predecir embarazo en programas de fertilización in vitro.

25 Identificación de microdeleciones en el cromosoma Y en pacientes con infertilidad masculina

Itzel Eevelyn Calleja Macías, Sandra Guadalupe Martínez Garza, Mayra Celina Callegos Rivas, Rocío Ortiz López, Lauro Gómez Guerra, Hugo A. Barrera Saldaña, Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez

El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de microdeleciones en el cromosoma Y en un grupo de pacientes mexicanos que presentan azoospermia y oligozoospermia, atendidos en Clínicas de Infertilidad. La frecuencia de microdeleciones encontrada en este estudio es muy similar a la informada para otras poblaciones. Este trabajo además de informar la frecuencia de microdeleciones en el cromosoma Y en nuestra población contribuyó a integrar un banco de DNA de pacientes con infertilidad masculina idiopática que será de utilidad para la búsqueda de las causas de esta afección.

32 Lesiones escamosas intraepiteliales en pacientes VIH seropositivas. Su frecuencia y asociación con factores de riesgo para neoplasia cervical

Ángel Emilio Suárez Rincón, Eduardo Vázquez Valls, Manuel Ramírez Rodríguez, Héctor Montoya Fuentes, María de la Paz Covarrubias Rodríguez, José Sánchez Corona

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de lesiones escamosas intraepiteliales (LEI), y su asociación con factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical, en pacientes VIH seropositivas. Se concluye que existe una prevalencia alta de positividad para ADN-VPH y de LEI en pacientes VIH seropositivas, que las identifica con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor, por lo que es importante desarrollar estrategias adecuadas para su detección, diagnóstico, manejo y seguimiento

44 Correlación estadística entre una prueba de transferencia y la transferencia embrionaria en un programa de reproducción asistida: análisis de los resultados

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dra. Andrea Baptista Pérez-Avellá, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky

Este estudio clínico tuvo como objetivo determinar si existe correlación estadística entre las variables observadas en la prueba de transferencia que se realiza previa a la estimulación ovárica con aquellas durante la transferencia real de embriones. Se concluye que la transferencia embrionaria es un paso fundamental para el éxito en los programas de FIV-TE. Sin embargo, se ve influenciado por una gran variedad de factores que en gran parte son médicos y otros mecánicos. Con estos resultados, se puede concluir que estadísticamente existe correlación entre las variables observadas durante la transferencia embrionaria real y la prueba, por lo que esta última es un elemento de gran utilidad dentro del proceso integral de fertilización in vitro, que ayuda a que la transferencia real no se convierta en un procedimiento ciego.

51 Instructivo para los autores



1 Editorial

Original articles. Basic investigation

5 Gestation in sheep after autotransplantation with cryopreserved ovarian tissue: evidence for oocyte viability after the freezing and transplantation procedures

Antonio Gutiérrez Gutiérrez, Marco Antonio Vargas Aguirre, Angélica Corona, Martha Echeverri Becerra, Claudia González Ortega, Sergio Mendoza Hurtado, Edith Monroy Avendaño, Guillermo Tovar Caballero

Freezing ovarian tissue is acquiring a greater significance due to the increase in oocyte long term survival rates, which provides young women with malignancies an alternative to preserve their fertility. The present study shows that ovarian function is adequately restored in oophorectomized sheep using ovarian tissue autotransplantation, and produced the first pregnancies obtained through this technique in Latin America. It is possible to assume that these results can be reproduced in women.

12 Risk factor for development of cervicouterine cancer associated to HVP: p53 Codon 72 polymorphism in women attending Hospital care

Dr. A. Sifuentes Álvarez, Dr. Miguel Reyes Romero

In codon 72 of the p53 antioncogene there are two alleles, arginine and proline; the arg/arg genotype has recently been identified as a risk factor for developing of cervicouterine cancer (CuCa) associated to human papillomavirus (HPV) infection. The aim of this work was to determine in a sample of women hospital the frequency of proline-arginine alleles and genotypes of p53 codon 72. The detection of a high percentage of arginine homocytotes suggests that this genotype, considered as a risk factor for cancer associated to oncogenic HPV, has a high prevalence in the north of Mexico. The determination of this kind of polymorphisms is important as preventive action with regard to identification of risk factors for CaCu associated to HPV infection.

Original articles. Clinic investigation

16 Fertilization rate ratio analysis as a predictive variable for the success of an *in vitro* fertilization program

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dr. José Antonio Garzón, Dr. Everardo Anta Jaen, Dra. Esperanza Carballo Mondragón

In order to determinate if fertilization rates can be used as a predictive factor for pregnancy induction in ETIVF-ICSI programs, we made a retrospective, observational and descriptive study. Mean fertilization rates averaged 54% and a 20.7% pregnancy rates using the transference method. After analyzing the fertilization rate in each group, a statistically significant linear correlation was observed ($P = 0.547$, CI 95%) with the pregnancy rate. A fertilization percentage greater than 50% can be used as a pregnancy predicting factor in *in vitro* fertilization programs.

25 Y Chromosome microdeletion identification in patients with male infertility

Itzel Evelyn Calleja Macías, Sandra Guadalupe Martínez Garza, Mayra Celina Gallegos Rivas, Rocío Ortiz López, Lauro Gómez Guerra, Hugo A. Barrera Saldaña, Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez

This study was made to determinate the prevalence of microdeletions in the Y chromosome in a group of Mexican patients presenting azoospermia and oligospermia, under treatment in the Infertility Clinics. No chromosomal alterations were detected in the patients, and no Y chromosome microdeletions were detected in control cases. This research not only reports the frequency of microdeletions in the Y chromosome in our population, but also contributes to the integration of a DNA bank for patients with idiopathic male infertility, which will be of great use in the search for the causes of this affection.

32 Squamous intraepithelial lesions in seropositive HIV female patients. Their frequency and association with cervical neoplasia risk factors

Ángel Emilio Suárez Rincón, Eduardo Vázquez Valls, Manuel Ramírez Rodríguez, Héctor Montoya Fuentes, María de la Paz Covarrubias Rodríguez, José Sánchez Corona

In order to determinate the prevalence of squamous intraepithelial lesions (SIL), and their association with known cervical neoplasia risk factors in seropositive HIV female patients was made a transversal study including 50 seropositive HIV female patients was carried out. We found that there is a high prevalence of positive DNA-HPV and SIL in seropositive HIV patients, which pose them in a higher risk of developing invasive cervical cancer. Thus, creating adequate strategies for the detection, diagnosis, management, and follow-up of these patients is of the utmost importance.

44 Statistical correlation between a transference test and embryonic transference in an assisted reproduction program: result analysis

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dra. Andrea Baptista Pérez-Avellá, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky

Embryonic transference is a fundamental phase for IVF-ET programs. However, a variety of factors can influence this procedure, some are medical and others are mechanical. Our results allow us to conclude that there is a statistical correlation between those variables observed during the real embryonic transference and the test, so the latter can be considered as a very useful element in the integral *in vitro* fertilization process, which prevents the real transference from becoming a blind procedure.

51 Authors instructions



Los hombres y los nombres en los premios anuales de la FEMEGO

Premio es el galardón, reconocimiento, remuneración o aumento del valor intrínseco de un proceso.

La Mesa Directiva de la Federación 1999-2001 encabezada por el Dr. Jorge Delgado Urdapilleta, hizo suya la propuesta de uno de sus miembros, el Dr. José Antonio Ruiz Moreno, de nominar a los premios anuales de la FEMEGO, que se otorgan anualmente en el Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia, con el patrocinio de la Industria Químico-Farmacéutica.

Se decidió sustentar en el reglamento esa decisión y adoptar los nombres, de quienes se pueden y deben considerar la vanguardia de la Ginecoobstetricia mexicana, y cuya trayectoria y hechos constituyen la formación de la escuela ginecoobstétrica mexicana.

Así se unían el galardón a los médicos especialistas de hoy con el reconocimiento a los médicos vanguardistas de ayer.

Pedro del Villar (1794-1851)

Nació en Actopan, hoy estado de Hidalgo. Ingresó a la Real Escuela de Cirugía, de donde egresó como Cirujano Romancista. Fue el primer catedrático de Obstetricia dentro de los fundadores del Establecimiento de Ciencias Médicas, organismo cuna de la Medicina Mexicana Moderna en 1833. La cátedra de Medicina Operatoria y Obstetricia se inauguró el 4 de diciembre de 1833, por el Coronel Médico Cirujano Pedro del Villar.

Perteneció al selecto grupo de Cirujanos Romancistas, cuyo espíritu, decisión y esfuerzo permitió a la Medicina mexicana surgir, desprendiéndose de la estructura escolástica, sustentándose en la ciencia de su tiempo, integrando la medicina y la cirugía, para formar y obtener al médico cirujano moderno de hoy, con una visión de gran apertura para el conocimiento, pero buscando soluciones nacionales a nuestros problemas.

Habiendo sido designado director del recién creado Cuerpo de Salud Militar, fue un promotor decidido de la educación del cuerpo médico militar, favoreció la formación de un hospital militar para la atención y la instrucción. Nombrado Primer Cirujano del Servicio Médico Militar. Orientado a la realización de la cirugía temprana, favoreció la enseñanza de la anatomía, de la cirugía y fue partidario decidido del ejercicio de la medicina y la cirugía como un todo.

Tradujo del francés *El arte de los partos* de M. Chevreull, cartilla para parteras y escribió "Consejos al pueblo mexicano sobre los medios más sencillos y fáciles de precaver y curar el Cólera Morbus epidémico".

Falleció en la ciudad de México y fue enterrado en el convento del Carmen, en San Ángel.

Juan María Rodríguez (1828 - 1894)

Nació en la ciudad de México. Estudió en San Gregorio en el Seminario Conciliar y luego pasa a la Escuela de Medicina. Se gradúa en 1855 con la tesis "La práctica de la Obstetricia en México". Inicialmente discípulo y luego profesor adjunto de Aniceto Ortega, fue profesor de la clínica obstétrica, la cual aplicó con una base médica. Se considera revolucionó la práctica de la obstetricia, fue de los que aplicó métodos antisépticos antes que los europeos.

Médico del Departamento de Partos Clandestinos del Hospital de Pobres y Casa de Maternidad. Intelectual y filósofo aplicó a la clínica de Obstetricia los conceptos de modernidad, utilizando el conocimiento, el sentido común y la disciplina. Escribió el Manual del Arte de los Partos premiado por la Academia Nacional de Medicina, que tuvo múltiples reimpresiones y se convirtió en texto de Medicina; publicó más de 100 trabajos de experiencia clínica, realizó los Cuadros Sinópticos de Obstetricia y su famosa Guía Clínica del Arte de los Partos.

Hizo la primera operación de Porro en México. Fue Presidente de la Academia Nacional de Medicina en 1884. Se le considera el creador de la Escuela Gineco-Obstétrica Mexicana. Autor de "Breves Consideraciones sobre las Condiciones Higiénicas de las Maternidades". Dominaba cinco idiomas, autoridad en griego y latín, así como de Química, de la que fue profesor en la Escuela Nacional Preparatoria. Combatió la charlatanería y la homeopatía.

Falleció en la ciudad de México en 1894.

Nicolás San Juan (1847 - 1919)

Nació en Toluca, estado de México. Ingresó al Seminario Conciliar y en 1866 decidió estudiar Medicina. Brillante como estudiante, fue preparador de Anatomía, interno en el Hospital de San Juan de Dios en el servicio del Dr. Agustín Andrade en el año de 1870, hizo su tesis sobre "Inyecciones Intrauterinas", se graduó en 1872. Participó en la elaboración de diversas tesis recepcionales. Fue médico del Hospital Morelos.

Logró ser Prosector de Anatomía por oposición, ganándole a Ricardo Vértiz en 1878, al siguiente año salió al extranjero en el viaje de formación acostumbrado entonces; realizó estancias en Nueva York y en Francia en las clínicas de Pean, Guyon y Cheron; en Viena con el Prof. Von Ferwald, en Alemania con Schroeder y Martin y en Inglaterra con Lister y Robert Tait. A su regreso en 1886 a México, ocupa la cátedra de Anatomía Descriptiva en la Escuela Nacional de Medicina por la muerte de don Francisco Ortega y del Villar y que permuta con el Dr. Porfirio Parra por la de Clínica Ginecológica, desarrollando una escuela en su servicio del Hospital Morelos. Se retira de la enseñanza en 1894 y del ejercicio médico quirúrgico en 1906.

Fue designado Profesor Honorario de la Escuela Nacional de Medicina en 1913. Se le considera el Padre de la Ginecología mexicana.

Realizó la primera histerectomía vaginal el 13 de febrero de 1878. Miembro de la Academia Nacional de Medicina desde 1873; también perteneció a la Sociedad Filoiátrica. Legó parte de sus bienes a la fundación del "Sanatorio Infantil Nicolás San Juan". Autor de más de 20 trabajos científicos y creador de instrumental y estrategias de diagnóstico y tratamiento ginecológico.

Falleció en el pueblo de San Ángel, México, en 1919.

Eliseo Ramírez (1888-1940)

Nació en Guadalajara, Jalisco. Estudió la preparatoria en el Instituto Científico y Literario de Pachuca, Hidalgo. Inició sus estudios de Medicina en la Escuela Nacional de Medicina de la Universidad Nacional de México, en 1907. Fue preparador de Física y ensayador en una compañía minera siendo aún estudiante. Practicante y luego médico interno en el Hospital Juárez. Se graduó en 1914 con la tesis "La fisiología de la Neurona". Fue jefe de Clínica Médica en la Escuela de Medicina, después en 1916, jefe de Clínica Quirúrgica, también en la Escuela Nacional. En plena Revolución fue invitado como Profesor de Patología General a la Escuela Médico Militar, donde le otorgaron el grado de Teniente Coronel.

Fue Profesor de Anatomía y Fisiología en la Escuela Nacional Preparatoria, en esa época participó en un grupo selecto de brillantes mentes, encabezados por Dn. Isaac Ochoterena, junto con Helia Bravo, Clemente Robles y otros, forman la base de lo que más tarde será el Instituto de Biología y fundan la Revista Mexicana de Biología. Médico del Instituto de Higiene en la Sección de Biología.

Fue profesor de Patología Quirúrgica en la Escuela Nacional de Medicina y de Anatomía Patológica en la Escuela Médico Militar. Director de Sanidad en el entonces Departamento de Salubridad Pública (1924-1926) y después Presidente de la Comisión Dictaminadora de Medicamentos. Nombrado Director del Instituto de Higiene en 1930, en 1935 Jefe del Laboratorio Central, participó en la Campaña Antivenérea, también participó activamente en la transformación de la prostitución reglamentada.

Director del Hospital de Enfermedades Tropicales de 1939 hasta su muerte.

Su obra magna la constituye El Ritmo Sexual Vaginal en la Mujer publicado 1928 con antecedentes de trabajo desde 1920 con el Dr. Ochoterena y en 1922 con la Nota Preliminar Acerca de la Citología del Flujo Menstrual. Publicó mas de 30 trabajos científicos de diversa índole. Autor de dos libros El Aparato Genital Femenino y Patología General.

La descripción de la citología vaginal en la mujer es obra de Eliseo Ramírez, en descargo de Papanicolaou, está la referencia al trabajo del científico mexicano en su comunicación.

Verdadero intelectual, hablaba nueve idiomas, precursor de la genética, matemático, filósofo, artista, inquieto físico, hombre disciplinado siempre se mantuvo estudiando e investigando hasta el final, presidió la Sociedad de Eugenesia. Ingresó a la Academia Nacional de Medicina en 1922, fue su Secretario en 1924.

Falleció en la ciudad de México.

Se presentan en orden cronológico, las viñetas biográficas de los personajes que la FEMEGO pretende honrar con la nominación de los Premios Anuales, reconociendo su aportación a la Medicina mexicana, su valor como miembros de la vanguardia de la ciencia moderna y como iniciadores de la Ginecología y Obstetricia mexicanas, y sobre todo, de su escuela.

Premio en investigación básica "Eliseo Ramírez"

Premio en investigación clínica "Juan Ma. Rodríguez"

Premio en materiales audiovisuales (videos) "Nicolás San Juan"

Premio en carteles "Pedro del Villar"

Dr. Roberto Uribe Elías



Gestaciones en ovejas autotrasplantadas con tejido ovárico criopreservado: evidencia de viabilidad ovocitaria posterior al proceso de congelación y trasplante

Antonio Gutiérrez Gutiérrez, Marco Antonio Vargas Aguirre, Angélica Corona Martha, Echeverri Becerra, Claudia González Ortega, Sergio Mendoza Hurtado, Edith Monroy Avendaño, Guillermo Tovar Caballero

Resumen

La congelación de tejido ovárico está adquiriendo gran importancia por un incremento en las tasas de supervivencia a largo plazo de mujeres jóvenes con enfermedad maligna, que necesitan tener alternativas para preservar su fertilidad. **Objetivos.** 1. Evaluar la viabilidad fisiológica del tejido ovárico autotrasplantado. 2. Determinar si existe diferencia entre dos crioprotectores utilizados, dimetilsulfóxido (DMSO) y propanodiol (PROH). **Diseño.** Estudio experimental y prospectivo para evaluar la viabilidad del tejido ovárico después de congelación y autotrasplante en ocho ovejas. **Material y método.** Se realizó ooforectomía bilateral en ovejas bajo anestesia general. La corteza ovárica se disecó y se congeló ya sea en DMSO (1.5M) o PROH (1.5M) con sacarosa. Se realizó autotrasplante del tejido descongelado entre uno y seis meses posteriores y determinaciones semanales de progesterona para evidenciar la funcionalidad del tejido ovárico. Una vez que se obtienen niveles ovulatorios, las ovejas fueron expuestas al macho de forma continua en búsqueda de gestaciones. **Resultados.** Se consiguió retorno de actividad ovulatoria en siete de ocho ovejas autotrasplantadas (87.5%) en un tiempo promedio de 62.8 ± 9.1 días evidenciado por niveles séricos de progesterona. Estos hallazgos fueron independientes del crioprotector utilizado. Se lograron dos gestaciones, las cuales hasta el momento son evolutivas evaluadas por ultrasonido. **Conclusiones.** El presente estudio nos demuestra una adecuada restauración de la función ovárica en ovejas ooforectomizadas con autotrasplante de tejido ovárico y las primeras gestaciones logradas por esta técnica en Latinoamérica. Es posible suponer que estos resultados son reproducibles en mujeres. ◇

Palabras clave: Gestación, autotrasplante, tejido ovárico criopreservado, viabilidad ovocitaria (Gutiérrez Gutiérrez A, et al. Gestaciones en ovejas autotrasplantadas con tejido ovárico criopreservado: evidencia de viabilidad ovocitaria posterior al proceso de congelación y trasplante. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 5).

Instituto de Ciencias en Reproducción Humana (VIDA), León, Guanajuato y Biotecnología y Reproducción Especializada, Rancho Santa María de Bolaños, Ciudad Manuel Doblado, Guanajuato.

53 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Primer Lugar de Investigación Básica

Freezing ovarian tissue is acquiring a greater significance due to the increase in oocyte long term survival rates, which provides young women with malignancies an alternative to preserve their fertility. **Objectives.** 1. Assessing the physiological viability of ovarian tissue auto-transplants. 2. Determining possible differences between the two cryoprotectors that were used: dimethyl sulfoxide (DMSO) and propanediol (PROH). **Design.** Experimental and prospective study assessing ovarian tissue viability after freezing and auto-transplantation in eight female sheep. **Materials and methods.** A bilateral oophorectomy was performed on the sheep under general anesthesia. The ovarian cortex was dissected and frozen using either DMSO (1.5 M) or PROH (1.5) with saccharose. The thawed tissue was auto-transplanted within the following one to six months, and weekly progesterone measurements were carried out in order to assess ovarian tissue functionality. Once ovulation levels were obtained, the female sheep were continuously exposed to the male in order to obtain the gestation process. **Results.** Ovulation activity was recovered in seven of the eight female sheep (87.5%) submitted to auto-transplants within an average period of time of 62.8 ± 9.1 days, as evidenced by serum progesterone levels. These findings were obtained regardless of the cryoprotector used. Two gestations were obtained, and these are evolving normally, as assessed by ultrasonic methods. **Conclusions.** The present study shows that ovarian function is adequately restored in oophorectomized sheep using ovarian tissue auto-transplantation, and produced the first pregnancies obtained through this technique in Latin America. It is possible to assume that these results can be reproduced in women. ♦

Key words: gestation, auto-transplant, cryopreserved ovarian tissue.

(Gutiérrez Gutiérrez A et al. Gestation in sheep after autotransplantation with cryopreserved ovarian tissue, evidence for oocyte viability after the freezing and transplantation procedures. *Ginec Obstet Mex* 2003; 71: 5).

Introducción

El incremento en las tasas de supervivencia a largo plazo de mujeres jóvenes con una enfermedad maligna, ha hecho necesario el disponer de alguna alternativa para preservar su fertilidad. La congelación de óvulos, tejido ovárico y embriones han sido propuestas para lograr esta finalidad, de ellas, la congelación del tejido ovárico es la que está adquiriendo mayor importancia en este campo.

El primer intento de criopreservar y trasplantar tejido ovárico se realizó en 1953 en Londres.¹ El tejido ovárico de ratón fue congelado a -79°C en glicerol y solución salina, descongelado y trasplantado en animales ooforectomizados subcutáneamente. Existió actividad hormonal suficiente para cornificar el epitelio vaginal. En 1960 se logró restaurar la fertilidad de ratones mediante el autotrasplante de tejido ovárico descongelado en la bursa.²

A pesar de estos importantes hallazgos, la investigación en este campo fue abandonada durante muchos años. Los avances en reproducción asistida y criobiología, tanto en humanos como en animales, lograron brindar un mejor entendimiento de los principios de congelación celular, mejorar los agentes crioprotectores y los instrumentos disponibles. Esto generó un renovado interés en la criopreservación ovárica, aunado al aumento de la supervivencia de mujeres y niñas sometidas a procedimientos de radioterapia y quimioterapia,³ a quienes se les debía buscar una alternativa para preservar su función reproductiva.

En 1994 Gosden y colaboradores⁴ logran restaurar la fertilidad en una oveja por medio de autotrasplante de tejido ovárico previamente congelado. La similitud del tejido ovárico de oveja con el humano en cuanto a tamaño y densidad de folículos se refiere, generó un interés creciente por la criopreservación de tejido ovárico, inclusive, en 1996, se publican los pri-

meros informes de criopreservación ovárica en pacientes oncológicas.⁵

Se ha intentado la congelación de ovocitos, embriones y la congelación de tejido ovárico para posterior maduración *in vitro* de ovocitos o trasplante. La primera congelación de ovocitos con éxito fue informada por Chen y colaboradores en 1984,⁷ sin embargo, varias dificultades han evitado que esta técnica se difunda en los grupos de reproducción, por tener bajas tasas de supervivencia y fertilización y un incremento en alteraciones cromosómicas.⁸ Con el advenimiento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI),⁹ se mejora sustancialmente la fertilización de los ovocitos descongelados, mejorando las perspectivas de esta técnica.¹⁰ Sin embargo, la congelación de ovocitos para preservar la función reproductiva en mujeres después de algún procedimiento de quimioterapia o radioterapia es de poca valía por necesitar de hiperestimulación ovárica y captura folicular, procedimiento que no puede llevarse a cabo en niñas prepúberes. En las mujeres adultas, no es por el momento la técnica idónea, por tener pocas posibilidades de éxito, y requerir de varias capturas foliculares para asegurar una población de ovocitos suficiente, hecho que no es recomendable por retrasar el tratamiento oncológico. Además, las condiciones anímicas en ese momento suelen no ser buenas para someterse a estos tratamientos largos e invasivos.

La congelación embrionaria es una técnica que tiene posibilidades de gestación adecuada,¹¹ sin embargo, se enfrenta a las mismas dificultades para la captura de óvulos enunciada anteriormente, aunado a que en muchas ocasiones la paciente no cuenta con pareja. La evolución incierta que estas pacientes pueden tener en su padecimiento oncológico hace que el congelar embriones no sea recomendable. Muchos problemas éticos y legales pueden surgir en los casos que no sea posible transferir estos embriones, ya sea por fallecimiento o por malas condiciones físicas de la paciente. Actualmente la congelación del tejido ovárico para almacenarlo y posteriormente trasplantarlo o realizar maduración *in vitro* de los óvulos es la técnica que ofrece un mejor panorama para preservar la fertilidad de mujeres jóvenes con cáncer. Nosotros informamos previamente un estudio preliminar de criopreservación de tejido ovárico en ovejas, en donde demostramos una adecuada conservación histológica de su estructura utilizando dos tipos de criopreservadores, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propanodiol (PROH), sugiriendo la posibilidad de trasplantarlo para comprobar su viabilidad fisiológica.⁶ Ahora presentamos los resultados obtenidos en cuanto a ciclos ovulatorios y el logro de las primeras gestaciones logradas por esta técnica en Latinoamérica.

Objetivos

Los objetivos de este estudio fueron: 1. Evaluar la viabilidad fisiológica del tejido ovárico criopreservado auto-trasplantado mediante determinaciones hormonales y/u obtención de gestaciones. 2. Determinar si existe diferencia entre dos crioprotectores utilizados, dimetilsulfóxido y propanodiol.

Material y método

Estudio prospectivo realizado en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción. Se realizó laparotomía media y ooforectomía bilateral bajo anestesia general endovenosa, en 15 ovejas de la raza Kathadin de entre 7 y 12 meses de edad y con un peso mayor de 30 kg. El tejido ovárico fue colocado en medio α -minimum essential (α -MEM) y transportado a una campana de flujo laminar para disecar la corteza ovárica utilizando una hoja de bisturí para obtener piezas no más gruesas de 2 mm. La corteza fue entonces dividida en tres partes: una fijada en solución de Buin durante dos horas y posteriormente en formaldehído para evaluación histológica en fresco y dos partes congeladas ya sea en DMSO 1.5M (Sigma, St Louis MO) o propanodiol 1.5M (Sigma, St. Louis MO) con 0.1 g de sacarosa (Sigma, St. Louis MO). Las muestras fueron agitadas para promover una equilibración rápida durante 30 minutos a 4°C en viales criogénicos de 1 mL. Posteriormente las muestras fueron congeladas en un protocolo de congelación lenta en el sistema de criopreservación CL 2000 (Standard System, Kansas, City, USA) iniciando a -6°C a una tasa de -0.5°C/min. Se realizó *seeding* manual a -6°C y se conservó la misma temperatura durante un periodo de estabilización de 5 minutos. Cuando la temperatura alcanzó -32°C los viales fueron sumergidos en nitrógeno líquido y depositados en un tanque de nitrógeno líquido.

El tejido ovárico se descongeló colocándolo a temperatura ambiente durante dos minutos y en baño de agua a 20°C por 5 minutos. Se realizaron cuatro lavados del tejido con medio α -MEM a 37°C para eliminar el criopreservador y manteniéndolo en estas condiciones hasta su trasplante. EL proceso de descongelación se realizó simultáneo al inicio de la laparotomía para el trasplante y descongelando aleatoriamente de uno de los dos criopreservadores que habían sido utilizados durante el proceso de congelamiento. Transcurrió un periodo de entre uno y seis meses para realizar el auto-trasplante de tejido ovárico. Durante este tiempo y posterior al trasplante se realizaron tomas sanguíneas semanalmente para evaluar la función ovulatoria de las ovejas. Se realizaron determinaciones séricas de

progesterona, considerando niveles ovulatorios por arriba de 2 pg/mL. Las muestras fueron analizadas mediante inmunoensayo enzimático (TOSOH). Se realizó laparotomía media bajo anestesia general inhalatoria, se realizó disección del peritoneo de ambas fosas ováricas para realizar el trasplante. Se colocó la porción de la corteza ovárica en el lugar seleccionado y fue fijado con prolene 6-ceros, manteniendo una adecuada hemostasia y manejo de los tejidos.

Una vez obtenidos los niveles ovulatorios de progesterona sérica, las hembras fueron expuestas a macho de forma continua en espera de gestaciones, diagnosticadas mediante el estudio de fracción β de la hormona gonadotropina coriónica en sangre y corroborada por ultrasonido rectal.

Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media $\pm$ DE. Para la comparación estadística entre grupos se utilizó la Chi cuadrada. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico para ciencias sociales (SPSS).

Resultados

Realizamos ocho autotrasplantes de tejido ovárico, cuatro en los que se utilizó DMSO y cuatro con propanodiol como crioprotectores. En el cuadro I se muestran las características individuales de cada animal trasplantado.

Del total de las ocho ovejas trasplantadas, siete retornaron a actividad ovulatoria evidenciada por pruebas hormonales de progesterona sérica (87.5 %). El tiempo medio de retorno a función ovulatoria fue de 62.8 ± 9.1 días (rango de 60-82 días). La oveja que no retornó a ciclos ovulatorios presentó múltiples adherencias en peritoneo en la cirugía del autotrasplante.

Ya se han logrado dos gestaciones en las ovejas trasplantadas. En la primera oveja gestante se utilizó DMSO y actualmente tiene tres meses de gestación. En la segunda oveja gestante se utilizó PROH y cuenta con dos meses de gestación.

En la figura 1 se muestran los valores de progesterona de las ovejas previos a ooforectomía (controles), después de realizar ésta y posterior al trasplante, en donde se puede evidenciar que los valores de progesterona en el periodo de ooforectomía disminuyen con respecto a los controles y ovejas autotrasplantadas.

La figura 2 muestra gráficamente el comportamiento individual de una de las ovejas gestantes (oveja 1). Se obtienen niveles ovulatorios de progesterona en su etapa de control, los cuales descienden por debajo de 2 ng/mL al realizar la ooforectomía y retornan a cifras ovulatorias después de 60 días de haber realizado el trasplante. Actualmente esta oveja es la que tiene más días de realizado el trasplante (467), todo el tiempo con adecuada función ovárica y finalmente la primera en lograr gestación.

Discusión

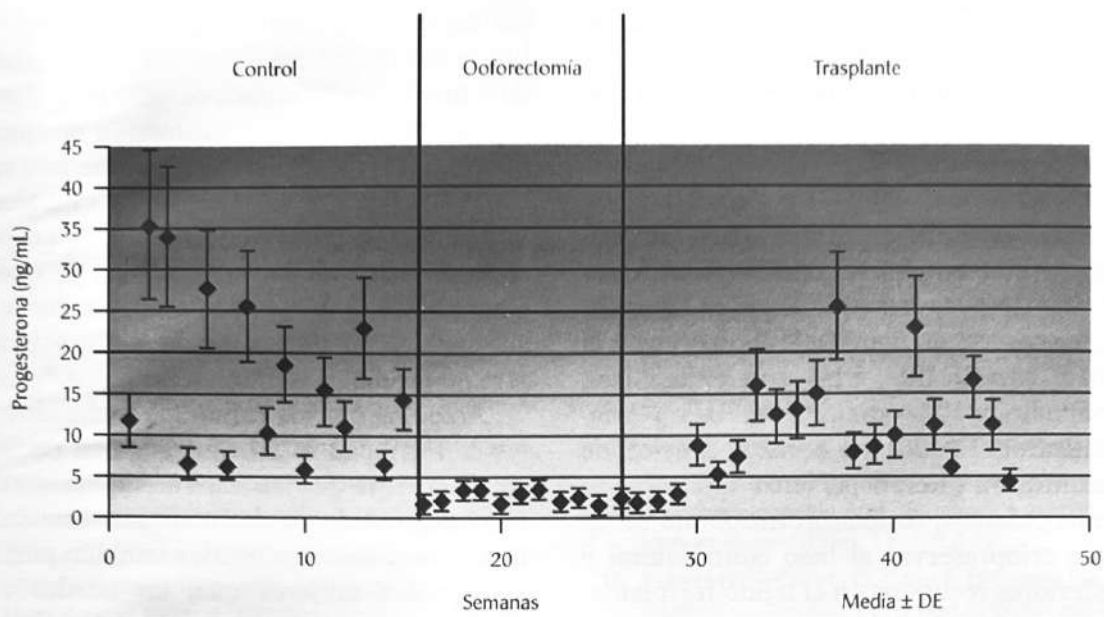
El presente estudio nos demuestra una adecuada restauración de la función ovárica en ovejas ooforectomizadas con autotrasplante de tejido ovárico. Ya previamente habíamos demostrado la conservación de la estructura histológica del tejido ovárico, habiendo descongelado una pequeña porción para evaluación histológica⁶ y ahora logramos evidenciar la funcionalidad del mismo tejido al ser trasplantado.

Nuestros hallazgos de viabilidad del tejido ovárico posterior al proceso de congelación y descongelación son consistentes con otros estudios que han realizado criopreservación en ovejas,¹² ratas¹³ y en humanos.¹⁴ Distintos protocolos de congelación han sido utilizados para este propósito, así mismo, diversos crioprotectores han sido utilizados, siendo el DMSO y el propanodiol

CUADRO I Características individuales de ovejas trasplantadas

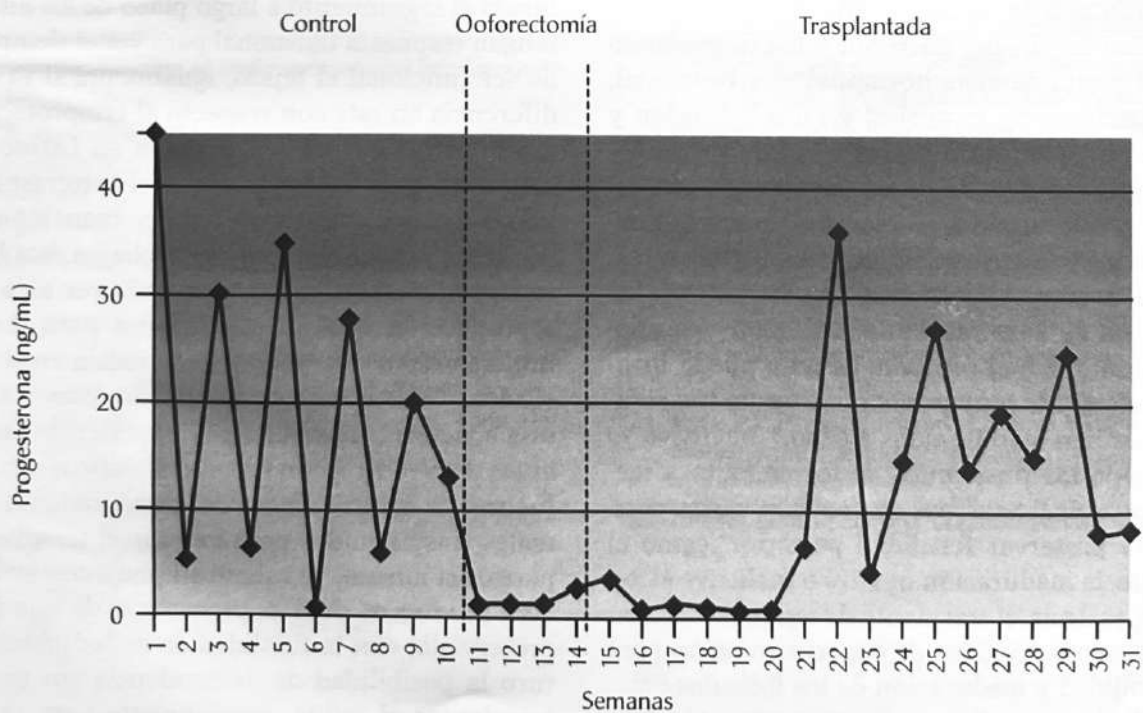
	Días de trasplante	Días para ovulación	Criopreservador	Complicaciones
Oveja 1	467	60	DMSO	Ninguna
Oveja 2	453	51	PROH	Adherencias leves
Oveja 3	415	72	DMSO	Ninguna
Oveja 4	380	58	PROH	Ninguna
Oveja 5	324	60	DMSO	Ninguna
Oveja 6	322	-	PROH	Adherencias severas
Oveja 7	270	78	DMSO	Adherencias leves
Oveja 8	270	61	PROH	Ninguna

FIGURA 1



Valores semanales de progesterona expresados como la media $\pm$ DE previos a ooforectomía, antes de trasplante y posterior a autotrasplante.

FIGURA 2



Valores de progesterona en la oveja número 1, mostrando actividad ovulatoria en los periodos de control y trasplante. Los valores en el periodo de ooforectomía fueron menores de 2 ng/mL.

los que han tenido mejor aceptación. Hovatta y colaboradores¹⁵ evaluaron los efectos histológicos de la criopreservación en biopsias corticales de ovarios humanos comparando ambos crioprotectores y no encontraron diferencias entre ambos en cuanto a número y morfología de folículos. Newton y colaboradores¹⁴ utilizaron biopsias de tejido ovárico criopreservadas en DMSO, etilenglicol, glicerol y propilenglicol. Posterior a la descongelación, el tejido ovárico fue trasplantado a las cápsulas renales de ratones inmunodeprimidos y 18 días después recuperados para su análisis histológico. Se encontró un porcentaje de supervivencia folicular de 74 % con DMSO, 84 % con etilenglicol, 44 % con propanodiol y 10 % con glicerol. Salle y colaboradores¹² utilizaron DMSO en corteza ovárica de ovejas. No encontraron diferencias entre tejido fresco y criopreservado. Además, realizaron trasplante de tejido ovárico sin criopreservar al lado contralateral y seis meses posteriores recuperaron el tejido trasplantado sin encontrar cambios histológicos.

Nosotros no encontramos diferencias entre los dos criopreservadores utilizados, DMSO y propanodiol, en la estructura histológica⁶ ni en la viabilidad del tejido al ser trasplantado, por lo que consideramos que pueden ser utilizados indistintamente. Esta aseveración la deberemos confirmar hasta ver si la funcionalidad a mediano o largo plazo es similar.

No solamente se han realizado estudios en donde se demuestra una recuperación del tejido ovárico histológicamente, sino que ya se ha logrado verificar la adecuada actividad del mismo posterior a la criopreservación desde el punto de vista hormonal^{16,17} y funcional, al lograr el nacimiento de ovejas⁴ y ratas.¹⁸ Gosden y colaboradores trasplantaron ovejas y lograron recuperación de la función ovárica en un tiempo de entre 12 y 16 semanas y lograron dos gestaciones de seis animales trasplantados.⁴ Salle y colaboradores¹⁷ lograron restauración de la secreción ovárica de esteroides a las cuatro semanas de autotrasplante sin lograr gestaciones en su estudio. En el presente estudio pueda brindar, ya que solamente muy pocos intentos de trasplante en humanos han sido llevados a cabo,²⁰ inclusive ya se han realizado los trasplantes de forma exitosa mediante laparoscopia.²¹ Sabemos que existen varias posibilidades para preservar fertilidad posterior, como el autotrasplante, la maduración *in vitro* o inclusive el xenotrasplante, es decir, el trasplante de tejido ovárico en animales inmunodeprimidos de experimentación para lograr la viabilidad y maduración de los folículos.^{22,23}

Dentro de las complicaciones que estas técnicas puede tener y que se prevén desde ahora, es que ciertos padecimientos oncológicos, especialmente las enfermedades mieloproliferativas como el linfoma, pue-

den transmitirse después de la criopreservación y trasplante de tejido ovárico. Shaw y colaboradores²⁴ trasplantaron un fragmento de tejido ovárico de ratón con linfoma a receptoras sanas. La enfermedad se desarrolló y mató a siete ratones de siete trasplantados en fresco y a seis de siete trasplantados a receptoras de tejido ovárico congelado. Estas evidencias han creado ciertos cuestionamientos sobre el uso de esta técnica, sin embargo, siguen recomendándose aún en pacientes con enfermedades mieloproliferativas, ya que el autotrasplante no es la única opción de retornar a la fertilidad, sino que se puede realizar la maduración *in vitro* o *in vivo* en animales inmunodeprimidos.²⁵

Actualmente los esfuerzos realizados para conservar la fertilidad están centrados en pacientes jóvenes con cáncer, ya que las tasas de supervivencia se han venido mejorando paulatinamente. Sin embargo, debemos pensar que esta técnica también puede ser útil para aquellas mujeres que, en edades reproductivas avanzadas y por motivos personales, desean posponer por un periodo prolongado la consecución de un embarazo. De no realizar la criopreservación de tejido ovárico, estas mujeres retornarán tardíamente a los centros de reproducción para búsqueda de embarazo y en muchas ocasiones la mejor alternativa para ellas serán los óvulos donados.

Los resultados de este estudio demuestran la viabilidad fisiológica que puede mantener el tejido ovárico posterior a la criopreservación. Será de suma importancia el seguimiento a largo plazo de los animales que tengan respuesta hormonal para ver el tiempo que puede ser funcional el tejido, igualmente si existe alguna diferencia en este con respecto al crioprotector utilizado. Informamos por vez primera en Latinoamérica la consecución de gestaciones con el autotrasplante de tejido ovárico criopreservado. Cabe mencionar que muy pocos grupos a nivel mundial trabajan esta línea de investigación en animales, pero cada vez más centros de reproducción ofrecen esta técnica para realizarse en mujeres, sin contar con la experiencia en el manejo de tejidos. Consideramos de mucha importancia tener una adecuada capacitación y experiencia en la técnica antes de ofrecerla con fines terapéuticos a mujeres. Actualmente continuamos con el seguimiento de los animales trasplantados para evaluar el trasplante a largo plazo, así mismo, ya estamos trabajando en la maduración *in vitro* de óvulos, procedente de este tejido criopreservado, con la finalidad de poder ofrecer en el futuro la posibilidad de descendencia sin necesidad de trasplantar el tejido, especialmente para mujeres con enfermedades mieloproliferativas.

Es posible suponer que estos resultados son reproductibles en mujeres, debido a que las caracterís-

ticas de los ovarios de ovejas son muy similares a las de humanos, aunque es importante realizar una experimentación adecuada con el tejido humano y poder evaluar el daño que el proceso de criopreservación pueda tener en los ovocitos. Con los avances en

el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno del cáncer, muchas pacientes jóvenes podrán recurrir a este tipo de técnicas, conservando su capacidad reproductiva y la información genética propia de sus gametos. ◇

Referencias bibliográficas

1. Parkes AS, Smith AU. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proc Roy Soc* 1953; 140: 455-67.
2. Parrot DMY. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fert* 1960; 1: 230-41.
3. Boring CC. Cancer statistics. *CA* 1994; 44: 7-26.
4. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degree C. *Hum Reprod* 1994; 9: 597-603.
5. Bahadur G, Steele SJ. Ovarian Tissue cryopreservation for patients. *Human Reprod* 1996; 11: 2215-6.
6. Gutiérrez A, Corona MA, Vargas MA, Méndez-Sachida P, Flores MS, Gallardo E. Effect of cryopreservation on sheep ovarian tissue comparing two cryoprotectants: Dimethylsulfoxide (DMSO) and 1,2 Propanediol. *Fertil Steril* 2000; 74: S214-S215.
7. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; ii: 884-886.
8. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 193-207.
9. Palermo G, Joris H, Devroey P, Steirteghem V. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340; 17-18.
10. Kazem R, Thompson LA, Srikanthrajah A, Laing MA, Hamilton MPR, Templeton A. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 2650-4.
11. Ludwig M, Al-Hasani A, Felberbaum R, Diedrich K. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and futures perspectives. *Hum Reprod* 1999; 14 (suppl 1): 162-85.
12. Salle B, Lomage J, Franck M, Isoard L, Rudigoz RC, Guerin JF. Freezing, thawing, and autograft of ovarian fragments in sheep: preliminary experiments and histologic assesment. *Fertil Steril* 1998; 70: 124-8.
13. Corleta HE, Corleta O, Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril* 1998; 70: 16-19.
14. Newton JI, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 1996; 11: 1487-91.
15. Hovatta O, Silye R, Krausz T, Abir R, Margara R, Trew G, Lass A, Winston RML. Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectans. *Human Reprod* 1996; 11: 1268-72.
16. Corleta HVE, Corleta O, Capp E, Edelweiss MI. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintain hormone secretion. *Fertil Steril* 1998; 70: 16-19.
17. Salle B, Lornage J, Demirci B, Vaudoyer F, Poirel MT, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF. Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep. *Fertil Steril* 1999; 72: 366-70.
18. Gunasena K, Villines PM, Critser E, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12: 101-6.
19. Donnez J, Bassil S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum Reprod update* 1998; 4: 248-59.
20. Oktay K, Karlikaya R, Gosden R, Schwarz R. Ovarian function after autologous transplantation of frozen-banked human ovarian tissue. *Fertil Steril* 1999; 72(suppl 1): S21.
21. Oktay K, Aydin BA, Karlikaya G. A technique for laparoscopic transplantation of frozen-banked ovarian tissue. *Fertile Steril* 2001; 75: 1212-6.
22. Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 2000; 73: 599-603.
23. Oktay K, Newton JI, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998; 13: 1133-8.
24. Shaw JM, Bowles J, Koopman P. et al. Fresh and cryopreserved ovarian tissue from donors with lymphoma, transmit the cancer to graft recipients. *Human Reprod* 1996; 11: 1668-1673.
25. Debate. Ovarian banking for cancer patients. *Hum Reprod* 1997; 12: 403-5.

Factores de riesgo para cáncer cervicouterino por IVPH: polimorfismo del codón 72 del gen oncosupresor *p53* en mujeres que acuden a atención hospitalaria

Dr. A. Sifuentes Álvarez, Dr. Miguel Reyes Romero

Resumen

En el codón 72 del antioncogén *p53* hay dos alelos, arginina y prolina; el genotipo arg/arg ha sido identificado recientemente como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCu) asociado con infección por virus de papiloma humano (VPH). El objetivo de este trabajo fue determinar en una muestra de mujeres la frecuencia de alelos y genotipos prolina-arginina del codón 72 del gen *p53*. El estudio se realizó en mujeres que ingresaron a atención médica hospitalaria. Los alelos del codón 72 del gen *p53* se determinaron en ADN genómico por amplificación de secuencias específicas por reacción en cadena de polimerasa y análisis de los productos por electroforesis en agarosa. El equilibrio de Hardy-Weinberg para los genotipos se analizó por prueba de χ^2 . De 102 pacientes analizadas, el alelo *p53*-arginina correspondió a 67.64% y el alelo *p53*-prolina correspondió a 32.36%; 47 mujeres (46.10%) fueron homocigotos arg/arg, 11 mujeres (10.77%) fueron homocigotos pro/pro, 44 mujeres (43.13%) fueron heterocigotos arg/pro; la distribución de genotipos estuvo dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg. La detección de un alto porcentaje de homocigotos de arginina sugiere que este genotipo, considerado como factor de riesgo para cáncer por VPH onco-génicos, tiene alta prevalencia en el norte de México. La determinación de este tipo de polimorfismos es importante como medida preventiva dentro de la identificación de factores de riesgo para CaCu asociado a infección por VPH. ♦

Palabras clave: cáncer cervicouterino, *p53*, virus de papiloma humano.

(Sifuentes Álvarez A y Reyes Romero M. Factores de riesgo para cáncer cervicouterino por IVPH: polimorfismo del codón 72 del gen oncosupresor *p53* en mujeres que acuden a atención hospitalaria. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 12).

Abstract

In codon 72 of the *p53* antioncogene there are two alleles, arginine and proline; the arg/arg genotype has recently been identified as a risk factor for developing of cervicouterine cancer (CuCa) associated to human papillomavirus (HVP) infection. The aim of this work was to determine in a sample of women the frequency of proline-arginine alleles and genotypes of *p53* codon 72. The study was conducted in a sample of inpatient women at the hospital. *p53* codon 72 alleles were determined in genomic ADN by amplification of specific sequences by

Hospital General, SDD y Laboratorio Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad Juárez. Durango, Durango.

LIII Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Villahermosa Tabasco, México
Tercer Lugar de Investigación Básica

χ^2 test. From 102 analyzed samples, *p53*-arginine allele corresponded to 67.64% and *p53*-proline allele corresponded to 32.36%; 47 women (46.10%) were arg/arg homocigotes, 11 women (10.77%) were pro/pro homocigotes, 44 women (43.13%) were arg/pro heterocigotes; the genotype distribution was within the Hardy-Weinberg equilibrium. The detection of a high percentage of arginine homocigotes suggests that this genotype, considered as a risk factor for cancer associated to oncogenic HPV, has a high prevalence in the north of Mexico. The determination of this kind of polymorphisms is important as preventive action with regard to identification of risk factors for CaCu associated to HPV infection. ♦

Key words: Cervicouterine cancer, *p53*, human papiloma virus.

(Sifuentes Álvarez A y Reyes Romero M. Risk factor for development of cervicouterine cancer associated to HVP: *p53* codon 72 polymorphism in women attending Hospital care. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 12).

Introducción

El virus del papiloma humano (VPH) fue oficialmente declarado por la Organización Mundial de la Salud en 1995 como carcinógeno para el humano,¹ no obstante lo anterior, de las mujeres infectadas con VPH sólo un pequeño grupo desarrollará cáncer, de ahí que se piense que además de las infecciones deben coincidir diversos factores de riesgo para la transformación neoplásica del epitelio cervical infectado por VPH. Uno de estos factores involucra variantes del VPH, las infecciones con los llamados virus de alto riesgo predominantemente VPH-16 y VPH-18 han sido así reconocidos como la principal causa de cáncer cervical y sus lesiones precursoras. El polimorfismo del codón 72 del antioncogén *p53* se han vinculado recientemente al riesgo de desarrollar cáncer cervicouterino (CaCu); Storey y colaboradores demostraron que la variante de *p53*-arginina es más susceptible a la degradación mediada por la proteína E6 del VPH que la variante *p53*-prolina.² La acción viral depende de la expresión de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano, al parecer, la oncoproteína E6 forma un complejo con el supresor de tumores *p53*, lo que facilita la ubiquitinación de *p53*, señal necesaria para que *p53* pueda ser degradado por proteasomas, lo que tiene como consecuencia la pérdida del papel regulador de *p53* en la estabilidad genómica.³ Storey y colaboradores encontraron que el riesgo relativo para el genotipo arg-arg es de 7.² Estudios posteriores en diversas partes del mundo, principalmente en países desarrollados han arrojado resultados controvertidos, sin embargo, el alelo de arginina

ha sido detectado en aproximadamente 77% de pacientes con CaCu asociado a VPH y en uno de los estudios más recientemente publicados al respecto en relación con mujeres suecas, se confirma lo sugerido por Storey y colaboradores.⁴

Según las estadísticas internacionales el CaCu ocupa el primer lugar en mortalidad, situación que no puede ser aceptada debido a que es factible su prevención. En México, la tendencia que se presenta ha sido ascendente, alcanzando una tasa de 50 por 100,000 habitantes. Es una enfermedad que se ha convertido en un problema de salud pública en México y a nivel mundial por la morbilidad que se presenta.

La frecuencia de los alelos *p53*-arginina y *p53*-prolina varía entre distintas poblaciones y entre diversas latitudes.⁵ En los países en vías de desarrollo, particularmente en Latinoamérica, existen pocos estudios en cuanto a las variantes más frecuentes. Dada la importancia epidemiológica del CaCu en nuestro país, el objetivo de este trabajo fue analizar en una población de mujeres que acuden a atención hospitalaria la frecuencia del genotipo homocigótico *p53*-arg/arg como una primera aproximación a estudios epidemiológicos moleculares que ayuden en la identificación de este factor de riesgo y que pueden ser de utilidad en la prevención y manejo de este tipo de padecimientos.

Material y método

Se realizó un estudio observacional, prospectivo, transversal, descriptivo, tipo encuesta epidemiológica molecu-

lar, en el tiempo comprendido de agosto del 2000 a julio de 2001 integrando al azar en forma sistematizada a 102 pacientes que ingresaron a atención médica hospitalaria. Se determinó el polimorfismo del codón 72 del gen *p53* a las 102 pacientes en ADN genómico obtenido de sangre venosa utilizando el reactivo DNAzol (Molecular Laboratories, Inc., Cincinnati, Oh). Un microgramo de ADN se utilizó para amplificación por PCR de regiones específicas del gen *p53* que incluyen al codón 72; los iniciadores utilizados fueron: sentido, 5'TCCCCCTTGCCGTCCCA3'; antisentido, 5'CTGGTG CAGGGGCCACGC3' para el alelo arginina y sentido, 5'GCCAGAGGCTGCTCCCCC3'; antisentido, 5'CGTG CAAGTCACAGACTT3' para el alelo prolina.² Se utilizaron 40 ciclos de amplificación consistentes en 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 55°C y 30 segundos de extensión a 72°C en un termociclador Perkin-Elmer 2400. La integridad del ADN y los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en agarosa y visualización con luz ultravioleta previo ténido del ADN con bromuro de etidio.

Resultados y discusión

De las 102 muestras analizadas, el alelo *p53*-arginina correspondió a 67.64 %, el alelo *p53*-prolina correspondió a 32.36 % (Cuadro I); 47 mujeres (46.10 %) fueron homocigotos arg/arg, 11 mujeres (10.77 %) fueron homocigotos pro/pro, 44 mujeres (43.13 %) fueron heterocigotos arg/pro (Cuadro II); con una distribución de genotipos y resultado de χ^2 dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg.

En la figura 1 se ilustra la electroforesis en gel de agarosa de la muestra de sangre correspondiente a 13 mujeres del estudio, mostrando los genotipos arginina y prolina; las muestras 1,3,7,8 y 11 corresponden a heterocigotos de arginina prolina y 2,4,6,9,10,12 y 13 homocigotos de arginina-arginina; procedimiento que se realizó igual para el resto de las 89 muestras del estudio.

En varios estudios independientes se ha encontrado que el genotipo homocigótico *p53*-arginina representa un factor de riesgo para el desarrollo de CaCu,^{4, 6-8} confirmando la primera comunicación a este respecto hecha por Storey y colaboradores acerca de la susceptibilidad a la degradación de *p53* mediada por la proteína E6 de VPH oncogénicos; inclusive la oncoproteína E6 de VPH de bajo riesgo tal como VPH-11 puede degradar a *p53*-arg pero no a *p53*-pro. Así, el genotipo *p53*-arg se ha detectado en aproximadamente 77 % de pacientes con CaCu asociado con infección por VPH. No obstante lo anterior, los resultados de varios estudios en distintos países como Corea, Italia y el Reino Unido⁹⁻¹¹ han arrojado resultados contradictorios, lo que ha dado como resultado que aún no se alcance un consenso al respecto; algunos estudios han sido enfocados a intentar explicar estas discrepancias y uno de los factores encontrados que explican, al menos en parte, la contradicción entre distintos estudios, es la variación interlaboratorio en la determinación de los genotipos,¹² lo que puede llevar a una subestimación de la asociación entre *p53*-arg y CaCu asociado con VPH. Además de lo anterior, algunos de los estudios más recientes apoyan el concepto de que *p53*-arg confiere mayor riesgo para el desarrollo de CaCu

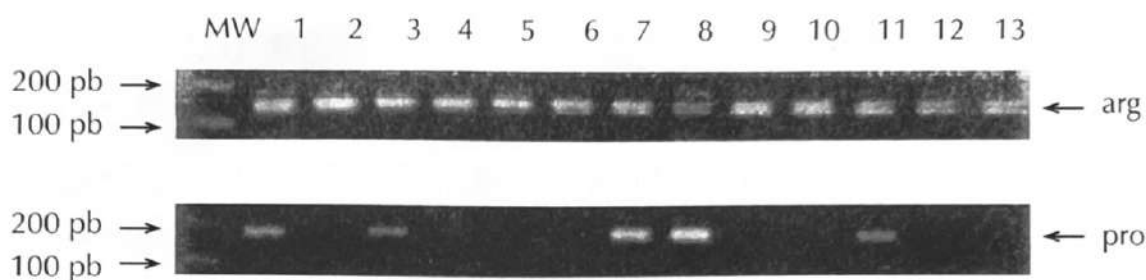
CUADRO I Frecuencia de alelos de arginina y prolina en pacientes que acuden a atención médica hospitalaria

Alelo	Número	Porcentaje
arg	138	67.64
pro	66	32.36
Total	204	100%

CUADRO II Distribución de genotipos del codón 72 del gen oncosupresor *p53*, en pacientes que acuden a atención hospitalaria

	Número de pacientes	Porcentaje	Total
arg/arg	47	46.10	47(46.10%)
arg/pro	44	43.13	44(43.13%)
pro/pro	11	10.77	11(10.77%)
Total	102	100	102 (100%)

FIGURA 1



Genotipos arg-pro de 13 mujeres. 1, 3, 7, 8 y 11 heterocigotos arg-pro; 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12 y 13, homocigotos arg-arg; MW, marcadores de peso molecular.

asociado con VPH.⁴ Puesto que en México y en general en toda Latinoamérica la infección cervical por VPH y la prevalencia de CaCu representan uno de los problemas más importantes de salud, se hace imperativa la realización de más estudios de riesgo genético como el presente en aras de que, de confirmarse las relaciones causales aquí comentadas, se puedan ofrecer medidas preventivas con mayor cobertura y mejor enfocadas a las poblaciones de alto riesgo para este tipo de padecimientos.

Conclusiones

La detección de un alto porcentaje de homocigotos de arginina en la muestra estudiada sugiere que este genotipo, considerado como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer por VPH oncogénicos, tiene alta prevalencia en el norte de México. La determinación de este tipo de polimorfismos es importante como medida preventiva dentro de la identificación de factores de riesgo para CaCu asociado a infección por VPH. ♦

Referencias bibliográficas

1. IARC/WHO Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer. 1995; 64.
2. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998; 393: 229-34.
3. Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2001; 98: 1218-23.
4. Zehbe I, Voglino C, Willander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 2001; 61: 608-11.
5. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994; 44: 266-70.
6. Van Duin M, Snijders PJF, Vossen MTM, Klaassen E, Voohorst F, Verheijen RHM, Helmerhorst TJ, Meijer C, Walboomers JMM. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81: 317-25.
7. Agorastos T, Lambropoulos AF, Constantinidis TC, Kotsis A, Bonitis JN. p53 codon 72 polymorphism and risk of intra-epithelial and invasive cervical neoplasia in Greek women. *Eur J Cancer Prev*. 2000; 9: 113-8.
8. Madeleine MM, Shera K, Schuwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wipf GC, Carter JJ, McKnight B, McDougall JK. The p53 Arg-72pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9: 225-7.
9. Baek WK, Cho JW, Suh SI, Suh MH, Shin DH, Cho CH, Lee TS, Cha SD. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Korean women. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 65-7.
10. Tenti P, Vesentini N, Rondo Spauldo M, Zappatore R, Migliora P, Carnevali L, Ranzani GN. p53 codon 72 polymorphism does not affect the risk of cervical cancer in patients from Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 435-8.
11. Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* 1998; 352: 1631.
12. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer*. 2000; 87: 528-33.



Análisis de la proporción en la tasa de fertilización como una variable predictiva del éxito en un programa de fertilización *in vitro*

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruiz Anguas, Dr. José Antonio Garzón Núñez,
Dr. Everardo Anta Jaen, Dra. Esperanza Carballo Mondragón

Resumen

Objetivo. El objetivo del presente estudio fue determinar si las tasas de fertilización pueden ser utilizadas como un factor predictivo para la consecución de embarazo en programas de FIVTE-ICSI. **Tipo de estudio.** Retrospectivo, observacional y descriptivo. **Material y método.** Se incluyeron 679 ciclos del programa de fertilización *in vitro*, en los que se utilizaron esquemas de supresión hipofisiaria con protocolo largo, stop, o el uso de antagonistas. La estimulación ovárica se realizó con menopausinas o FSH recombinante. Se excluyeron del estudio aquellas pacientes en las que se canceló el ciclo por falta de desarrollo folicular. Las variables estudiadas fueron edad, porcentaje de fertilización, tasa de embarazo, niveles de estradiol preovulatorio, número y calidad de ovocitos capturados, embriones transferidos y grosor endometrial el día de la transferencia y la presencia de embarazo. La prueba estadística para determinar correlación fue la P de Pearson con un intervalo de confianza de 95%, y la T de Student para establecer diferencias utilizando un intervalo de confianza de 95%. **Resultados.** Se analizaron 679 ciclos de los cuales, en 487 se realizó fertilización convencional y en 192 se realizó ICSI. La edad promedio de las pacientes fue de 34 ± 1.1 años, con niveles de estradiol preovulatorio $4,023 \pm 1,134$ pg/mL, la cantidad de ovocitos capturados fue de 11.7 ± 3.2 con una tasa de captura de 69.6%. La tasa de fertilización en promedio fue de 54% con una tasa de embarazo de 20.7% por transferencia. Al analizar la tasa de fertilización por grupos, se observó una correlación lineal estadísticamente significativa ($P = 0.574$ IC 95%) con tasa de embarazo. Al dividir a las pacientes en los dos grupos: FIV convencional e ICSI, se observó una correlación positiva mayor ($P = 0.827$ con IC 99%) en el primer grupo. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos en los otros parámetros estudiados, únicamente en relación con madurez de ovocitos, se observó un mayor porcentaje de profase I y metafase II en el grupo con ICSI. Al tomar como punto de corte 50% de fertilización, se determinó que éste tiene un valor predictivo negativo de 78.19%, con valor predictivo positivo de 25%, sensibilidad de 77.5% y especificidad de 25.6%. **Conclusiones.** El porcentaje de fertilización mayor a 50% puede ser utilizado como un factor pronóstico para predecir embarazo en programas de fertilización *in vitro*. ♦

Palabras clave: Fertilización *in vitro*, embarazo, ovocito

(Kably Ambe A, et al. Análisis de la proporción en la tasa de fertilización como una variable predictiva del éxito en un programa de fertilización *in vitro*. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 16).

Hospital Ángeles de las Lomas
Centro Especializado para la Atención de la Mujer (CEPAM). Unidad de Reproducción Asistida

III Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Villahermosa Tabasco, México
Primer Lugar de Investigación Clínica

Objective. Determining if fertilization rates can be used as a predictive factor for pregnancy induction in ETIVF-ICSI programs. **Type of study.** Retrospective, observational and descriptive. **Materials and methods.** Six hundred and seventy nine cycles of the *in vitro* fertilization program, using long protocol hypophyseal suppression, stop, or antagonsists, were included. Ovarian stimulation was carried out with menotropines or recombinant FSH. Those patients whose cycle was stopped due to the lack of follicular development were excluded. Variables under study were: age, fertilization percentage, pregnancy rate, pre-ovulatory estradiol levels, number and quality of captured oocytes, transferred embryos and endometrial thickness on the day of transference and the presence of pregnancy. The Pearson P Test with a 95% confidence interval and the Student T Test used to establish differences with a 95% confidence interval statistical analyses were applied. **Results.** Six hundred and seventy nine cycles were studied, 487 of which used the conventional fertilization method, and 192 used the ICSI method. Mean age among patients was 34 ± 1.1 years old, with pre-ovulatory estradiol levels of $4,023 \pm 1,134$ pg/mL, the average quantity of captured oocytes was 11.7 ± 3.2 with a capture rate of 69.6%. Mean fertilization rates averaged 54% with a 20.7% pregnancy rates using the transference method. After analyzing the fertilization rate in each group, a statistically significant linear correlation was observed ($P = 0.547$, CI 95%) with the pregnancy rate. After assigning patients to two different groups: conventional IVF and ICSI, a higher positive correlation was observed ($P = 0.827$, CI 99%) in the first group. No significant differences were observed in the remaining parameters between both groups, excepting oocyte maturity, where greater prophase I and metaphase II percentages were observed in the ICSI group. When 50% fertilization was taken as the cutting point, a 78.19% negative predictive value was determined, with a 25% positive predictive value, 77.5% sensitivity, and 25.6% specificity. **Conclusions.** A fertilization percentage greater than 50% can be used as a pregnancy predicting factor in *in vitro* fertilization programs. ♦

Palabras clave: Fertilización *in vitro*, embarazo, ovocito

(Kably Ambe A, et al. Fertilization rate ratio analysis as a protective variable for the success of an *in vitro* fertilization program. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 16).

Introducción

Pocas áreas en el campo de la medicina han sufrido una evolución tan vertiginosa como la que se ha observado en reproducción asistida. A partir del nacimiento de Louis Brown, el primer humano concebido a través de fertilización *in vitro*, se han desarrollado nuevas drogas que han favorecido la creación de protocolos de estimulación ovárica más eficientes al facilitar un mayor desarrollo en el número de folículos.¹ Por otro lado, con la ultrasonografía vaginal se ha logrado realizar un seguimiento más estrecho del ciclo, además de permitir la captura ovular a través de ésta vía en el momento en que las características foliculares indican madurez en el desarrollo y donde se ha evidenciado la presencia de un

endometrio bien desarrollado que será receptivo para la implantación del cigoto.¹

Aunado a estos avances, las técnicas y manipulación de gametos en el laboratorio han mejorado significativamente, lo cual ha permitido obtener mejores tasas de fertilización y embarazo. Hace una década el porcentaje rara vez excedía 15 %, actualmente algunos centros de reproducción han informado tasas de embarazo por arriba de 50 %.¹

A pesar de estos avances, el éxito de las técnicas de reproducción asistida no se manifiesta en todos los grupos; por ejemplo, las mujeres mayores de 39 años continúan presentando tasas bajas de éxito.^{2,3} Por lo anterior existe un interés permanente en desarrollar parámetros evaluatorios que permitan predecir la respuesta ovárica y las posibilidades de éxito en una pare-

ja que se somete a cualquier técnica de reproducción asistida. Dentro de estos factores pronósticos se encuentran la ya comentada edad materna, los niveles basales de FSH, las concentraciones de inhibina sérica y estradiol sérico preovulatorio, desarrollo endometrial, número de folículos desarrollados y embriones transferidos entre otros.^{1,4}

Es probable que la tasa de fertilización en los programas de reproducción asistida también pueda ser utilizada como factor pronóstico, ya que se ha correlacionado directamente con la posibilidad de lograr un embarazo.⁴

En cuanto a la edad materna ésta ha demostrado ser la variable única más importante que afecta los resultados en reproducción asistida. El efecto de la edad avanzada en los programas de fertilización *in vitro* (FIV) se manifiesta no únicamente en el patrón de respuesta ovárica a la estimulación hormonal, sino que también influye negativamente en la eficiencia de implantación, evidenciado por un incremento en las tasas de abortos espontáneos.²

En algunos centros se ha demostrado que la tasa de embarazo es de 12 % o menor y la tasa de aborto es de hasta 60 % en mujeres mayores de 39 años comparado con mujeres jóvenes.³ Por su parte en el programa de FIV de la Universidad de Cornell EUA se demostró que la tasa de embarazo disminuía de 46.3 % en mujeres menores de 30 años hasta 5.2 % para el grupo de mujeres de 42 años o mayores a pesar de que todos los grupos tuvieron un número similar de embriones transferidos.²

El antecedente de haber logrado embarazos previos ofrece un mejor pronóstico y este se implementa cuando esta gestación se logró con FIV y donde dicho ciclo culminó con el nacimiento de un recién nacido vivo.⁴ En un estudio realizado en 5,073 ciclos⁵ se observó que las parejas que habían logrado un embarazo por FIV tenían 33 % de posibilidades de lograr un segundo evento exitoso, comparado con 24 % de aquellas parejas que no habían concebido con esta técnica.

De igual manera, los niveles basales de FSH no únicamente predicen la tasa de embarazo, sino que además son un factor pronóstico muy importante en cuanto a cancelación de ciclos por mala respuesta a la estimulación ovárica.^{6,7} En un estudio realizado por Shariff⁶ donde se analizaron 344 mujeres de un programa de FIV se observó una tasa de cancelación de 5 % en aquellas mujeres con FSH < a 10.8 mUI/mL, y que se incrementaba hasta 30 % en aquellas mujeres con FSH > 10.8 mUI/mL. De la misma forma los niveles elevados de FSH se relacionaron con mayor dosis de gonadotropinas para la estimulación y un menor número de ovocitos recuperados.⁶

El nivel de estradiol sérico al inicio del ciclo también se ha considerado como factor pronóstico y cobra mayor trascendencia cuando se asocia con la FSH basal. Buyalos⁷ encontró que cuando los niveles de FSH en día 3 del ciclo eran < 13 mUI/mL y el estradiol < 80 pg/mL se obtenían las mejores tasas de embarazo; por arriba de estos niveles no se presentó ninguna concepción en el grupo estudiado. Estos hallazgos han sido encontrados en otros estudios en los que se ha establecido el punto de corte de 80 pg/mL de estradiol sérico como factor pronóstico en FIV.⁸

Se ha considerado que la producción de estradiol sérico por folículo maduro debe situarse entre 250-300 pg/mL; sin embargo, ha sido tema de controversia los niveles de estradiol séricos que pueden ser deletéreos para la implantación del embrión.⁹ Debido a las observaciones de los posibles efectos nocivos de los niveles elevados de estradiol sobre el endometrio ha sido necesario identificar a las pacientes que presentan una respuesta excesiva a la estimulación ovárica. Éstas se caracterizan por presentar estradiol preovulatorio mayor a 3,000 pg/mL y más de 15 ovocitos recuperados durante la aspiración folicular.¹⁰ A pesar de que algunos autores^{9,10,11} no han encontrado efecto alguno de los niveles de estradiol sobre la calidad ovocitaria y embrionaria, ni en tasas de implantación o embarazo, otros autores han observado alteraciones en la receptividad endometrial.¹²⁻¹⁴

Sin duda, la calidad embrionaria y el número de embriones son dos variables íntimamente relacionadas con las posibilidades de lograr el embarazo. Especialmente cuando se utilizan puntajes acumulados donde se evalúan aspectos morfológicos del embrión¹⁵⁻¹⁷ como presencia o ausencia de fragmentación, irregularidades en blastómeras y cantidad de células.

El número de embriones transferidos es una variable independiente que influye sobre las tasas de embarazo. Cuando se transfiere un embrión se pueden esperar tasas de embarazo alrededor de 15 %, se incrementa a 17 % al transferir dos embriones y hasta 40 % con tres o más.^{17,18} Sin embargo, el costo de incrementar el número de embriones lo constituye el aumento significativo en las tasas de embarazo de alto orden fetal.

Recientemente se ha observado que las tasas de embarazo probablemente se vean afectadas por el porcentaje de fertilización que se obtenga durante el ciclo de fertilización *in vitro*, observándose una relación lineal entre el porcentaje de fertilización y las tasas de embarazo, sobre todo cuando se encuentran tasas mayores a 80 %.¹ Es un hecho que la maduración ovocitaria es un evento fundamental para que se lleve a cabo una fertilización exitosa; los ovocitos maduros son capaces de ser inmediatamente fertilizados mientras que aquellos

en profase 1, requieren maduración *in vitro* antes de adquirir el potencial de fertilización.¹⁹ Por otro lado, aquellos inmaduros que aún poseen una vesícula germinal intacta a pesar de que maduren *in vitro* serán incapaces de resultar en un embarazo normal. Otros estudios han demostrado que la inmadurez ovocitaria es la principal causa que favorece la falla en la fertilización.²⁰ Además de la inmadurez nuclear existen otras características en el ovocito que parecen reducir su capacidad de fertilización, dentro de éstas se encuentran las condiciones de la zona pelúcida que difiere de la madura en su capacidad de proteólisis y unión espermática.²⁰ De igual forma se ha observado que los espermatozoides no llevan a cabo la descondensación de su cromatina en ovocitos inmaduros.^{20,21}

Con base en las observaciones anteriores se decidió realizar un análisis retrospectivo sobre el impacto que pueden tener las tasas de fertilización sobre la consecución de embarazo en un programa de FIV, teniendo como hipótesis que una fertilización cuantitativa y cualitativamente mejor por paciente es un factor predictivo para el logro de un embarazo.

Material y método

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional, y descriptivo en el que se incluyeron 679 ciclos, en pacientes candidatas al programa de fertilización *in vitro* del Centro Especializado para la Atención de la Mujer (CEPAM) a las cuales se realizó hiperestimulación ovárica controlada con captura ovular, fertilización *in vitro* convencional (FIV) o inyección intracitoplásmica de espermias (ICSI) y transferencia de embriones. Los criterios de exclusión fueron aquellas pacientes en las que no se llegó a realizar transferencia de embriones, o las que presentaron falla en la respuesta folicular.

En todas las pacientes antes de iniciar el ciclo de estimulación ovárica se corroboraron los siguientes parámetros: cavidad uterina normal por histerosalpingografía o histeroscopia, cultivos para *Chlamydia* y *Mycoplasma* negativos, antígeno superficie para hepatitis B y VIH negativos, VDRL, perfil TORCH, biometría hemática, química sanguínea, tiempos de coagulación, perfil tiroideo, valores hormonales de LH, FSH y estradiol en día 2-4 del ciclo y progesterona, prolactina en día 21 del ciclo.

Para la supresión hipofisiaria se utilizó el protocolo largo de fase lútea con acetato de leuprolide 0.5 mg/día sc (Relisser, Serono, México) iniciando el día 21 del ciclo previo, y disminuyendo dosis a 0.25 mg/día sc en el momento de iniciar estimulación ovárica. En otras pacientes se realizó esquema de "Stop", iniciando el día 21 del ciclo a dosis de 0.5 mg/día sc y se suspendió el

día de inicio de estimulación. En otro subgrupo se utilizaron antagonistas de GnRH de tercera generación con esquema de dosis múltiples (Cetrotide, Serono, México) 0.25 mg/día sc iniciando el día 6-7 del ciclo de estimulación, hasta el día de aplicación de hGC.

La estimulación ovárica se realizó con menotropinas o FSH recombinante (Pergonal o Gonal F Serono Lab. México) y la dosis se individualizó en cada paciente, el día de inicio se realizó USG endovaginal así como niveles de FSH, LH y estradiol para corroborar adecuada supresión hipofisiaria.

El ciclo de estimulación se monitorizó con ultrasonografía endovaginal utilizando equipo Aloka SSD- 1100 con transductor endocavitario 5 Mhz (Aloka Co. LTD), y niveles de LH y estradiol, aplicándose hGC 10,000 (Profasi. Serono Lab México) una vez que se observaron tres o más folículos de 18 mm de diámetro con niveles de estradiol entre 200-250 pg/mL por folículo maduro, 36 horas después de la aplicación de hGC se programó la captura ovular, bajo guía ultrasonográfica.

La transferencia embrionaria se realizó en día 3 posterior a la captura en la mayoría de los casos, sin embargo, en ocasiones fue en día 2 o 5 dependiendo del número y calidad embrionaria. El número de embriones transferidos fue entre 1-5 dependiendo de la edad de la paciente, calidad y disponibilidad embrionarias.

El soporte de fase lútea se inició 24 horas después de la captura ovular, con progesterona 100 mg cada 12 horas IM. Se realizó determinación de hGC en suero 14 días después de la transferencia, para corroborar embarazo, en caso de ser positiva, se realizó nueva determinación 48 horas después. Finalmente se verificó la presencia y número de sacos gestacionales por USG endovaginal tres semanas después de la transferencia.

Fueron excluidas del estudio aquellas pacientes en las que el ciclo de estimulación ovárica fue cancelado por mala respuesta folicular.

La fertilización fue valorada 18 horas después de haber inseminado los ovocitos, o realizado el ICSI, observando la presencia de preembriones en dos pronúcleos. Para determinar el porcentaje de fertilización se dividió el número de embriones en dos pronúcleos multiplicado por 100, dividido entre el número de ovocitos inseminados:

$$\frac{\text{No. embriones}}{\text{No. óvulos inseminados}} \times 100$$

No. óvulos inseminados

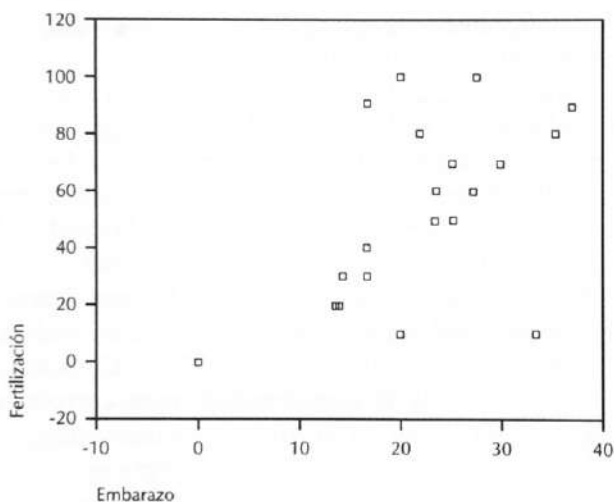
El número de folículos obtenidos, la tasa de fertilización, la calidad ovocitaria y la tasa de embarazo por transferencia fueron analizados con la prueba estadística de T de student para establecer diferencias, y la prueba de Pearson para establecer correlación.

Resultados

Se incluyeron en el estudio 679 pacientes a las que se les realizó hiperestimulación ovárica controlada con fertilización *in vitro* convencional o ICSI, y posteriormente transferencia embrionaria.

La edad promedio de las pacientes fue de 34.0 ± 1.1 años. En cuanto a los niveles basales de LH, FSH y estradiol en día 2-3 del ciclo, se observaron dentro de límites normales con FSH en promedio de 6.4 UI/L, LH 5.07 UI/L y estradiol de 61.7 pg/mL.

FIGURA 1



Relación entre tasa de embarazo y porcentaje de fertilización.

Al final del ciclo de estimulación los niveles de estradiol previos a la administración de LH fueron $4,023 \pm 1,134$ pg/mL en promedio por paciente, y la cantidad de folículos aspirados fueron una media de 16.8 ± 3.7 , observando niveles de estradiol sérico de 239 pg/mL por folículo aspirado. En cuanto a los ovocitos capturados fueron de 11.7 ± 3.2 por paciente, lo cual da una tasa de captura de 69.6%. De los ovocitos capturados, se observaron 9.2 maduros (Metafase I-II) en promedio.

La tasa de fertilización en general fue de 54%, y la de embarazo de 20.7% por transferencia.

En relación con las tasas de embarazo en función de los porcentajes de fertilización, se observó que existe una relación directamente proporcional entre ambos (Figura 1), al realizar análisis estadístico con prueba de Pearson, se detectó una asociación positiva con un valor de $p = 0.574$ a 95% de intervalo de confianza sin observar una diferencia significativa en cuanto a edad de paciente, grosor endometrial u ovocitos capturados, con excepción del grupo de pacientes con 90% de fertilización en los que fue mayor estadísticamente significativo (Cuadro I).

Al dividir a las pacientes en dos grupos, comparando a aquellas en las que se realizó ICSI con las pacientes de fertilización *in vitro* convencional, se observaron diferencias importantes, ya que el primer grupo presentaban una correlación positiva ($p = 0.384$) entre porcentaje de fertilización y tasa de embarazo, en cambio las pacientes del segundo grupo presentaban una mayor asociación con $p = 0.827$, estadísticamente significativa aun a 99% de intervalo de confianza (Figura 2).

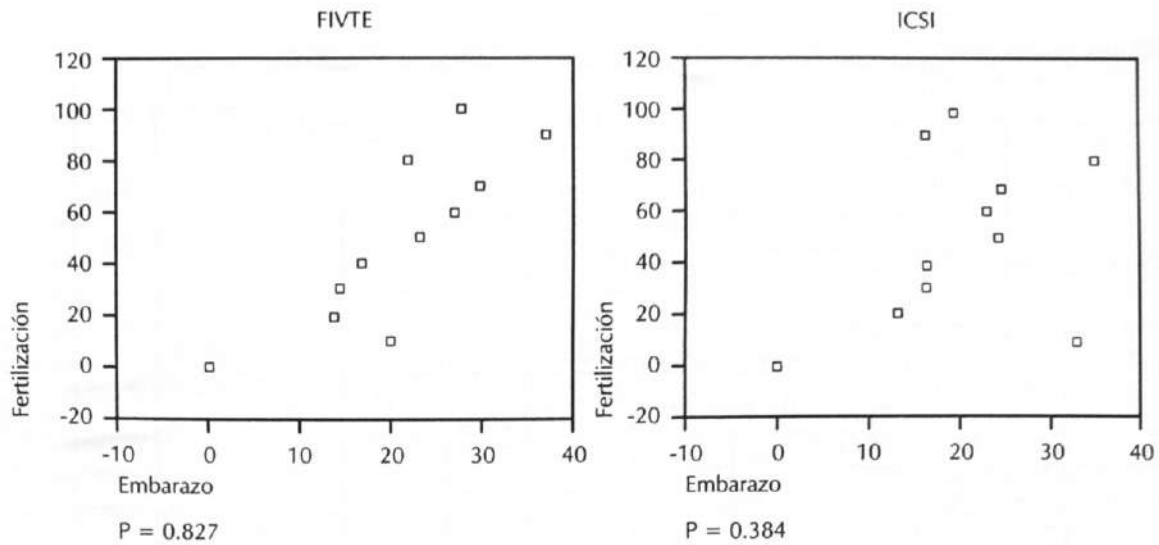
Al comparar los dos grupos de pacientes se observó que el nivel de estradiol preovulatorio, el nú-

CUADRO I Características de pacientes

Porcentaje de fertilización	Tasa embarazo ^a	Edad (años)	Ovocitos capturados	Embriones transferidos	Endometrio (mm)
0	0	35.5	8.05	0	10.47
10	26.5	32.9	10.62	1.07	10.38
20	13.45	33.18	13.30	1.83	12.28
30	15.48	34.62	11.63	2.71	10.57
40	16.67	35.19	13.53	3.55	10.66
50	24.26	33.62	12.54	3.34	10.91
60	25.40	33.61	13.07	3.91	10.65
70	27.36	33.33	11.48	4.12	10.49
80	28.58	33.55	11.48	4.48	10.83
90	26.75	34.29	17.20 ^b	4.48	11.02
100	23.75	34.83	6.91	3.18	10.41

(a) Correlación estadísticamente significativa con fertilización $p = 0.574$ (b) $p = 0.05$

FIGURA 2



Correlación fertilización y tasa de embarazo

CUADRO II. Características del ciclo

	FIVTE		ICSI	
	Media	Rango	Media	Rango
Edad (años)	34.05 ± 1.15	31-15	33.77 ± 1.2	31.8-35.3
Estradiol preovulatorio (pg/mL)	4,023 ± 1,134	21,965-6,683	4,380 ± 1,222	2,571-6,686
Folículos aspirados	16.8 ± 3.76	10-24	18.2 ± 4.03	10-24
Ovocitos capturados	11.07 ± 3.23	5-17	12.69 ± 3.52	5-17
Ovocitos inseminados	9.2 ± 2.77	2-13	9.06 ± 3.13	2-13
Ovocitos fertilizados	5.05 ± 3.4	0-12	4.85 ± 3.39	0-12
Embriones transferidos	2.9 ± 1.4	0-5	2.82 ± 1.49	0-5
Endometrio día transferencia (mm)	10.78 ± 0.41	10.2-11.7	10.78 ± 0.98	9.7-13.5

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros.

mero de folículos aspirados y los ovocitos capturados fueron mayores en las pacientes con ICSI (Cuadro II).

No se observaron diferencias estadísticas en estos parámetros. Las tasas de embarazo por transferencia fueron similares en ambos grupos: 20.76 % y 20.49 %.

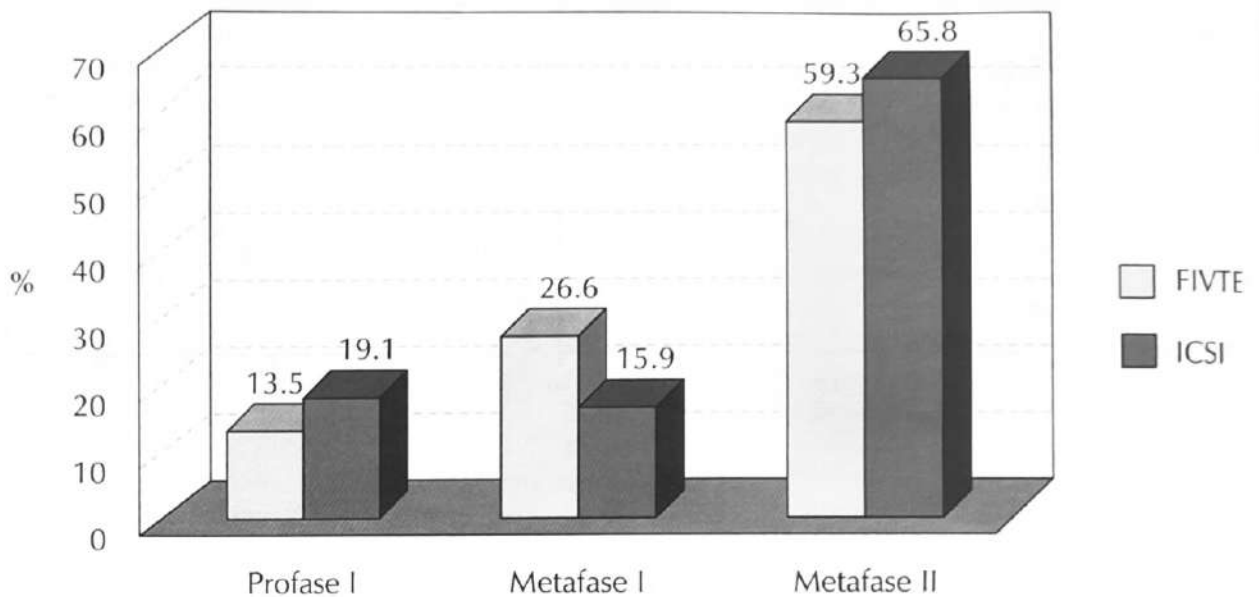
Por otro lado al analizar la calidad ovocitaria, se pudo apreciar en el grupo con ICSI una mayor cantidad de ovocitos en profase I y metafase II estadísticamente significativas a un intervalo de confianza de 95 % en relación al grupo con FIV convencional (13.5 % y 59.3 % contra 19.1 % y 65.8 % respectivamente), en relación a ovocitos en metafase I se observó que en el grupo de FIV convencional era mayor estadísticamente (Figura 3).

Con base en los resultados anteriores, se observó que al tomar 50 % de porcentaje de fertilización como punto de corte, este tiene un valor predictivo positivo de 25.0 % y un valor predictivo negativo de 78.19 % para lograr el embarazo, con una sensibilidad de 77.5 % y especificidad de 25.6 %.

Discusión

Dentro de los programas de reproducción asistida ha existido una evolución importante en cuanto a técnicas y tecnología, con la finalidad de lograr mejorar las posibilidades de conseguir un embarazo, de tal manera que a principios de los años noventa las tasas oscilaban

FIGURA 3



Calidad ovocitaria.

alrededor de 15 %, actualmente muchos centros informan tasas de 50 % o más, sin embargo, estos porcentajes no se aplican a todas las pacientes, como es el caso de mujeres con edad materna avanzada, reserva ovárica disminuida, etc.

Por tal motivo, se han tratado de identificar factores pronósticos que orienten a predecir buenos resultados, específicamente durante el proceso de estimulación y captura folicular; existen controversias en cuanto a los niveles de estradiol preovulatorio, ya que algunos investigadores proponen que no tiene ningún efecto sobre la calidad embrionaria y las tasas de implantación y embarazo,⁵⁶⁻⁵⁸ así mismo otros autores como Pellicer y colaboradores⁵⁹ han informado que niveles elevados de estradiol (mayores a 5,000 pg/mL) después de la captura folicular tienen un efecto deletéreo en cuanto a tasas de implantación y de embarazo, debido a una falla en la sincronía de la expresión de moléculas de adhesión endometrial durante la ventana de implantación,⁶⁰ sin embargo, la calidad ovocitaria no se ve marcadamente afectada en relación con los niveles de estradiol. Simon y colaboradores al comparar esquemas de estimulación con Step Down contra dosis continuas de FSH, observaron que los niveles de estradiol eran menores en el primer grupo ($1,919 \pm 477$ pg/mL), en comparación al segundo ($5,770 \pm 650$ pg/mL) y a su vez las tasas de implantación y embarazo mejoraron

notablemente (29.3 % contra 8.5 % y 64.2 % contra 24.2 %).⁶¹ Sin embargo, otros autores como Chenette⁶² no han observado dichos efectos.

En el presente estudio los niveles de estradiol preovulatorio en promedio fueron de $4,023 \pm 1,134$ pg/mL por paciente, con tasas de embarazo de 20.7 % por transferencia.

Otro factor pronóstico en el que se ha hecho énfasis es el tamaño folicular y la calidad ovocitaria. En ciclos naturales se ha correlacionado un diámetro de 20 mm del folículo con la madurez ovocitaria. En un estudio realizado por Wittmaack⁶³ observó que la mayor tasa de recuperación ovocitaria se tenía en folículos con volumen entre 3 y 4 mL, que corresponden a diámetros entre 18-20 mm, sin embargo, cuando el volumen folicular es mayor a 7 mL las tasas de recuperación disminuían, haciendo hincapié en que las tasas de fertilización se mantenían constantes cuando dicho volumen era mayor a 2 mL. Otros autores como Dubey y colaboradores,⁶⁴ al comparar ovocitos obtenidos de folículos con diámetros entre 10-14 mm, 16 a 22 mm y 22 a 26 mm observaron tasas de fertilización mayores en folículos con mayor diámetro (57.9 %, 69.8 % y 73.9 % respectivamente).

La calidad ovocitaria es un evento fundamental para que se lleve a cabo una fertilización exitosa, los ovocitos maduros son capaces de ser fertilizados inmedia-

tamente, mientras que aquellos en profase I requieren maduración *in vitro* antes de adquirir el potencial de fertilización.⁶⁴ Por otro lado, aquellos ovocitos inmaduros que aún poseen una vesícula germinal intacta a pesar de que maduren *in vitro* serán incapaces de resultar en un embarazo normal. Otros estudios⁶⁸ han demostrado que la inmadurez ovocitaria es la principal causa que favorece falla en la fertilización.

En el presente trabajo al tratar de comparar el porcentaje de fertilización con tasas de embarazo se observó una correlación directamente proporcional entre ambos, con una asociación estadísticamente significativa, sin embargo, cabe mencionar que al dividir a las pacientes en las que se realizó ICSI o FIV convencional, se observó que existía una correlación estadísticamente más importante en el segundo grupo; esto puede ser explicado porque en el primer grupo se obtuvo una mayor cantidad de ovocitos en profase I en los que se intentó la maduración *in vitro*, y esto modificó su calidad, sin embargo, la cantidad de ovocitos en metafase II también fue mayor en estas pacientes. Otro aspecto que puede relacionarse es el hecho que al realizar el proceso de fertilización *in vitro* convencional la fertili-

zación es más fisiológica, y puede existir una selección natural de aquellos ovocitos con alteraciones ultraestructurales o cromosómicas condicionando que los ovocitos maduros y estructuralmente normales lleven a cabo la fertilización, lo que a su vez da como resultado embriones de buena calidad con capacidad de implantación y por lo tanto de embarazo. Por otro lado en el ICSI la fertilización de los ovocitos es forzada al introducir el espermatozoide, y que quizás en ocasiones se inyecten ovocitos con alteraciones cromosómicas y/o genéticas.

Finalmente, en el presente estudio se logró correlacionar a la tasa de fertilización como un parámetro pronóstico, al observar una sensibilidad de 77.5% con un valor predictivo negativo de 78.19% para lograr embarazo cuando se toma como punto de corte una fertilización mayor a 50%. Aunque la especificidad sea de 25.6%.

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que en los programas de fertilización *in vitro* existen muchas variables que interactúan entre sí e intervienen en los resultados, y no basarse únicamente en un solo parámetro como factor pronóstico. ♦

Referencias bibliográficas

1. Templeton A, Muris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of *in vitro* fertilization treatment. *Lancet* 1996; 348: 1402-6.
2. Rosenwaks Z, Davis OK, Damario MA. The role of maternal age in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10: 165-73.
3. Romeu A, Muasler SJ, Acosta AA, Veeck LL, Diaz J, Jones GS. Results of *in vitro* fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. *Fertil Steril* 1987; 47: 130-6.
4. Tan SL, Doulye P, Maconochie N, Edwards R, Balen A, Bekir J, Brinsden P, Campbell S. Pregnancy and live birth rates of live infants after *in vitro* fertilization in women with a and without previous *in vitro* fertilization pregnancies: A study of eight thousand cycles at one center. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 34-40.
5. Croucher CA, Lass A, Margara R, Winston R. Predictive value of the results of a first *in vitro* fertilization cycle on the outcome of subsequent cycles. *Hum Reprod* 1998; 13: 403-8.
6. Sharif K, Elgendy M, Lashen H, Afnan M. Age and basal follicle stimulating hormone level is a better predictor of *in vitro* fertilization performance than age. *Fertil Steril* 1998; 105: 107-12.
7. Buyalos RP, Daneshmand S, Brzechffa PR. Basal estradiol and follicle stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. *Fertil Steril* 1997; 68: 272-7.
8. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995; 1136-40.
9. Sharara FI, McClamrock HD. High estradiol levels and high oocytes yield are not detrimental to *in vitro* fertilization outcome. *Fertil Steril* 1999; 72: 401-5.
10. Kably A, Barron J, Tapia RC, Karchmer S. Efecto de las concentraciones séricas de estradiol preovulatorio en la calidad de óvulos y preembriones en pacientes tratadas con fertilización *in vitro*. *Ginec Obstet Mex* 2000; 68: 435-41.
11. 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.
12. Pellicer A, Valbuena D, Cano F, Remohi J, Simón C. Lower implantation rates in high responders: evidence for an altered endocrine milieu during the preimplantation period. *Fertil Steril* 1996; 65: 1190-5.
13. Kolb BA, Najmabadi S, Paulson RJ. Ultrastructural characteristics of the luteal phase endometrium in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 1997; 67: 625-30.
14. Simón C, García Velasco JJ, Valbuena D, Peinado JA, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. 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.
15. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RC. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992; 7: 117-9.
 16. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AC, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12: 1545-9.
 17. Terriou PH, Christopher S, Giordetti C, Hans E, Jean Louis S, Roger R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril* 2001; 75: 525-31.
 18. Erenus M, Zouves Ch, Rajamahendran P, Leung S, Fluker M, Gomel V. The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertile Steril* 1991; 56: 707-10.
 19. Dubey AK, Wang HA, Duffy P, Penzias AS. The correlation between follicular measurements, oocytes morphology and fertilization rates in an in vitro program. *Fertil Steril* 1995; 64: 787-90.
 20. Avrech OM, Goldman GA, Rufas O, Stein A, Amit S, Yoles I, Pinakas H, Fisch B. Treatment variables in relation to oocytes maturation: Lessons from a clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 337-42.
 21. Wittmaack FM, Kreger DO, Blasco L, Tureck RW, Mastroianni L, Lessey BA. Effect of follicular size on oocytes retrieval, fertilization, cleavage and embryo quality in in vitro fertilization cycles: a 6 years data collection. *Fertile Steril* 1994; 62: 1205-10.



Identificación de microdeleciones en el cromosoma Y en pacientes con infertilidad masculina

Itzel Eevelyn Calleja Macías,² Sandra Guadalupe Martínez Garza,¹ Mayra Celina Gallegos Rivas,¹ Rocío Ortiz López,² Lauro Gómez Guerra,² Hugo A. Barrera Saldaña,² Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez¹

Resumen

La identificación de las causas genéticas de la infertilidad masculina tiene mucha relevancia, si se considera que ésta es responsable de 30-50% de los problemas de creación en las parejas. Anormalidades genéticas, entre las cuales se encuentran las microdeleciones del cromosoma Y son comúnmente detectadas en pacientes con azoospermia no obstructiva (7.8-21%) y con oligozoospermia (0-4.3%). La mayoría de estos pacientes es candidata para la realización de la inyección intracitoplasmática de espermias (ICSI) y se conoce la capacidad heredable de este defecto genético a los hijos varones. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de microdeleciones en el cromosoma Y en un grupo de pacientes mexicanos que presentan azoospermia y oligozoospermia, atendidos en Clínicas de Infertilidad. En este trabajo se analizaron 52 hombres infértiles (casos): 36 con azoospermia no obstructivos y 16 con oligozoospermia y 50 varones (controles) con fertilidad validada. A partir de sangre anticoagulada con EDTA y con heparina de cada individuo se extrajo el DNA genómico y se realizó el cariotipo, respectivamente. Este último fue analizado por técnicas de bandas G. Con cada muestra de DNA, mediante PCR se amplificaron 18 marcadores (STS) a lo largo del brazo largo del cromosoma Y (zonas AZF a, b, c y d) en pacientes azoospermicos, oligozoospermicos y controles. No se detectaron alteraciones cromosómicas en los pacientes, ni tampoco microdeleciones del cromosoma Y en los controles. En cinco pacientes azoospermicos (13.9%) se encontraron microdeleciones correspondientes a las zonas AZFb, c y d, mientras que en los pacientes con oligozoospermia no se encontraron microdeleciones. La frecuencia de microdeleciones encontrada en este estudio es muy similar a la informada para otras poblaciones. Este trabajo además de informar la frecuencia de microdeleciones en el cromosoma Y en nuestra población contribuyó a integrar un banco de DNA de pacientes con infertilidad masculina idiopática que será de utilidad para la búsqueda de las causas de esta afección.



Palabras clave: microdeleciones, cromosoma Y, infertilidad

(Calleja Macías IE, et al. Identificación de microdeleciones en el cromosoma Y en pacientes con infertilidad masculina. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 25).

Abstract

Identifying the genetic causes of male infertility is very important, considering they account for 30-50% of reproductive problems among couples. Genetic abnormalities, among which Y chromosome microdeletions are found, are commonly detected in patients with

¹Instituto de Ciencias en Reproducción Humana (Vida). León Guanajuato. ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

non-obstructive azoospermia (0-4.3%). Most of these patients are eligible for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and this genetic defect can be inherited by male children.

Objective. Determining the prevalence of microdeletions in the Y chromosome in a group of Mexican patients presenting azoospermia and oligospermia, under treatment in the Infertility Clinics. **Materials and methods.** This study included 52 infertile men (cases): 36 with non-obstructive azoospermia, and 16 with oligospermia; and 50 men (controls) whose fertility had been validated. The genomic DNA of each individual was obtained from his EDTA and heparin treated blood, and the corresponding karyotype determined. The karyotype was analyzed using G banding techniques. Eighteen markers (STS) corresponding to the chromosome Y long arm (AZFa, b, c, and d zones) were amplified in each DNA sample in all cases—azoospermic, oligospermic and controls—using the PCR method. **Results.** No chromosomal alterations were detected in the patients, and no Y chromosome microdeletions were detected in control cases. Five azoospermic patients (13.9%) presented microdeletions corresponding to the AZFb, c, and d zones, while no microdeletions were found in oligospermic patients. The frequency of microdeletions found in this study is very similar to that reported for other populations. **Conclusions.** This research not only reports the frequency of microdeletions in the Y chromosome in our population, but also contributes to the integration of a DNA bank for patients with idiopathic male infertility, which will be of great use in the search for the causes of this affection. ♦

Key words: microdeletions, Y chromosome, infertility.

(Calleja Macías IE et al. Y chromosome microdeletion identification in patients with male infertility. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 25).

Introducción

La infertilidad de la pareja es atribuible a la mujer aproximadamente en 40 % de los casos,¹ y en otro 40 % al varón, el restante 20 % se atribuye a problemas de ambos.² La infertilidad masculina ha sido asociada con diferentes causas: anatómicas, endocrinas, infecciosas, nutricionales y genéticas.³ Sin embargo, todas estas causas van a producir el mismo efecto sobre la cantidad y la calidad de espermias.

Entre los factores genéticos más comúnmente asociados con la infertilidad masculina están:

1. Anormalidades en el cariotipo y 2. microdeleciones en el cromosoma Y. El cariotipo puede desmascarar anormalidades genéticas potencialmente transmisibles en el hombre infértil, incluyendo desórdenes numéricos y estructurales de los cromosomas. Promediando la incidencia general de anomalías cromosómicas en cinco estudios de hombres oligozoospermicos y en seis estudios de hombres azoospermicos, se obtuvieron frecuencias de cromosomopatías de 4.6 y 13.7 %, respectivamente.^{4,5} Debe notarse que en el grupo de azoospermicos, predominaron las anormalidades en el cromosoma sexual

(12.6 %), mientras que en el grupo de oligozoospermicos las anomalías autosómicas fueron las más frecuentes (3.0 %). Estos estudios concuerdan en que a medida que disminuye la concentración de espermatozoides, aumenta el número de anormalidades cromosómicas. Además de la importancia clínica de estas anormalidades cromosómicas, su caracterización también puede conducir a identificar y localizar genes involucrados en la infertilidad masculina.^{4,5}

El cromosoma Y es necesario para la fertilidad masculina.⁶ La infertilidad masculina se ha asociado con alteraciones estructurales del cromosoma Y en hombres azoospermicos y seriamente oligozoospermicos.⁷ El intervalo 5-6 de la banda Yq11 de este cromosoma contiene un "factor de infertilidad" o "factor azoospermico" (AZF).⁸ Esta región consta de por lo menos cuatro zonas (a, b, c y d) que controlan la espermatogénesis. Diferentes deleciones de esta región pueden causar defectos importantes que van desde azoospermia no obstructiva hasta oligozoospermia.⁹ Por ejemplo, el gen SCO (células de Sertoli exclusivamente, en inglés) ubicado en la zona AZFa, está relacionado con testículos poblados únicamente con células de Sertoli y azoospermia. El gen RBM

(motivo de unión al RNA) localizado en la zona AZFb, está relacionado con azoospermia. El gen DAZ (deletado en azoospermia) localizado en AZFc es responsable de hipospermatogénesis. La zona AZFd se asocia con ligera oligozoospermia o cuenta normal, pero con anomalía de la morfología del espermatozoide. Hasta la fecha no se ha determinado ninguna correlación clara entre el tamaño y/o la localización de la mutación con la severidad del defecto espermatogénico.¹⁰ Cuando se observa una falla testicular por azoospermia o por oligozoospermia, las microdeleciones en el cromosoma Y pueden estar presentes entre 7.8-21 % y 0-4.3 %, respectivamente. La variación entre estos estudios puede ser atribuida a los criterios de inclusión tomados para cada uno de ellos, así como a las técnicas utilizadas y la población analizada.¹¹⁻¹³

Antes se pensaba que era imposible tratar a los hombres que presentaban una cuenta muy baja de espermatozoides; actualmente, la ICSI permite la fertilización con un solo espermatozoide.¹⁴ En la actualidad aun las causas más difíciles de esterilidad masculina han podido tratarse con éxito mediante las técnicas de microinyección de espermatozoides.¹⁵ Aunque la ICSI aparentemente no representa ningún riesgo para los productos, en estos se ha observado un ligero incremento en el número de anomalías cromosómicas,¹⁶ además de que implica la transmisión artificial de una anomalía genética ligada al cromosoma Y a la descendencia masculina.¹⁷

El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de microdeleciones en el cromosoma Y en un grupo de pacientes mexicanos que presentan azoospermia y oligozoospermia, los cuales son atendidos en Clínicas de Reproducción Asistida por infertilidad masculina.

Material y método

Pacientes

Se incluyeron en el estudio 52 pacientes infértiles de origen idiopático que tuvieran azoospermia no obstructiva, y oligozoospermia ($< 5 \times 10^6/\text{mL}$) de entre 20 y 40 años, 16 varones con oligozoospermia, 36 con azoospermia no obstructiva. Se recolectaron muestras de sangre periférica con EDTA y heparina como anticoagulante. De cada una de las muestras con EDTA se extrajo DNA genómico mediante la técnica de TSNT (2 % Tritón, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y se constituyó un banco. Se estimó la calidad y cantidad de cada DNA en geles de

agarosa. Las muestras con heparina sirvieron para realizar un cultivo de linfocitos y posteriormente realizar el cariotipo con bandas G.

El grupo control lo conformaron los DNA de 50 hombres fértiles (comprobado con pruebas de paternidad empleando los marcadores Apo B y D1580). Este grupo fue tomado del banco de DNA de la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, por lo que no se le realizó cariotipo.

Cariotipo

Se realizó un cultivo celular a partir de 10 gotas de sangre periférica (anticoagulada con heparina). Transcurrido el tiempo, las células se detuvieron en mitosis mediante la adición de colchicina. Se realizó la ruptura de las membranas celulares y se fijaron con solución fijadora. Se realizaron las laminillas (metafases) y posteriormente se tiñeron con el colorante Giemsa y se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión y se realizó el análisis del cariotipo.

Microdeleciones del cromosoma Y

La detección de las microdeleciones en sujetos afectados se realizó mediante la amplificación de STS (los cuales son secuencias de copia única que se encuentran a lo largo del genoma y sirven como marcadores de posición cromosómica), la detección de la delección depende de la carencia de amplificación por PCR de uno o más de estos STS en un segmento cromosómico.

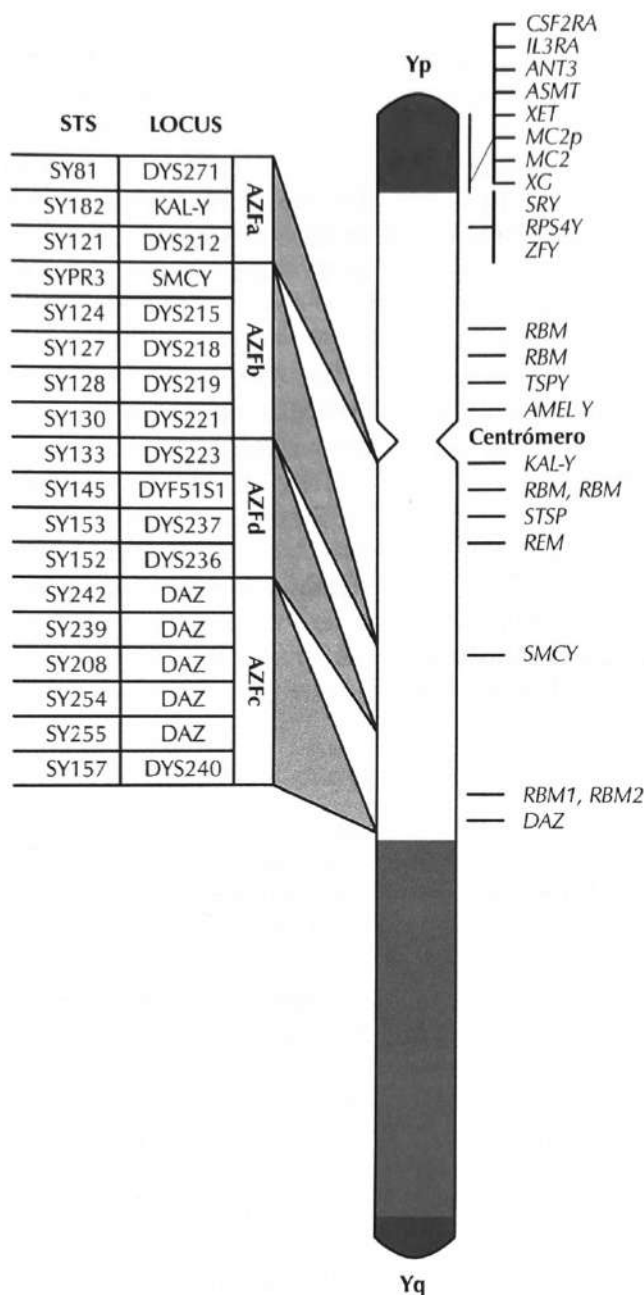
La tipificación de los STS se realizó con el estuche comercial *The Y Chromosome Deletion Detection System*, versión 1.1 de Promega, amplificando 18 STS que se encuentran en el brazo corto del cromosoma Y (Figura 1). Siguiendo las instrucciones de la casa comercial para la realización de la PCR e incluyendo los controles positivos y negativos en cada una de las reacciones. Se detectaron las microdeleciones del cromosoma Y por la presencia o ausencia de la banda al realizar una electroforesis en geles de agarosa al 3 %.

Resultados

La detección de alteraciones cromosómicas se realizó únicamente en el grupo de casos. De los 52 cariotipos procesados, ninguno presentó alteraciones cromosómicas.

Se realizó la detección de las microdeleciones del cromosoma Y con el estuche comercial. De los 50 DNA utilizados como controles, ninguno presentó

FIGURA 1

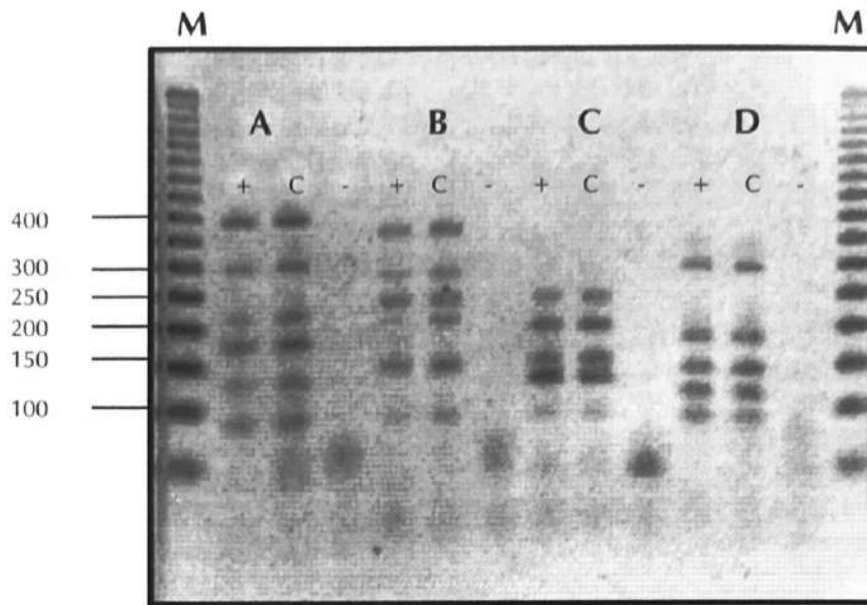


Mapa de los STS a lo largo del cromosoma Y indicando su posición. El estuche comercial distribuido por la compañía promega permite la amplificación de regiones que flanquean AZFa y cubren AZFb, AZFc, AZFd incluyendo DAZ, Kal-Y, SMCY y loci que flanquean otros genes clave relacionados con espermatogénesis (RBM1, DFFRY y DBY).

microdeleciones (Figura 2). En cuanto a los 52 DNA de los pacientes con azoospermia y oligozoospermia analizados, se encontraron cinco pacientes con microdeleciones del cromosoma Y (Figura 3). En el cuadro I se muestran los resultados de estos pacientes con sus respectivos STS que no amplificaron y la zona AZF a la que corresponden. La prevalencia de

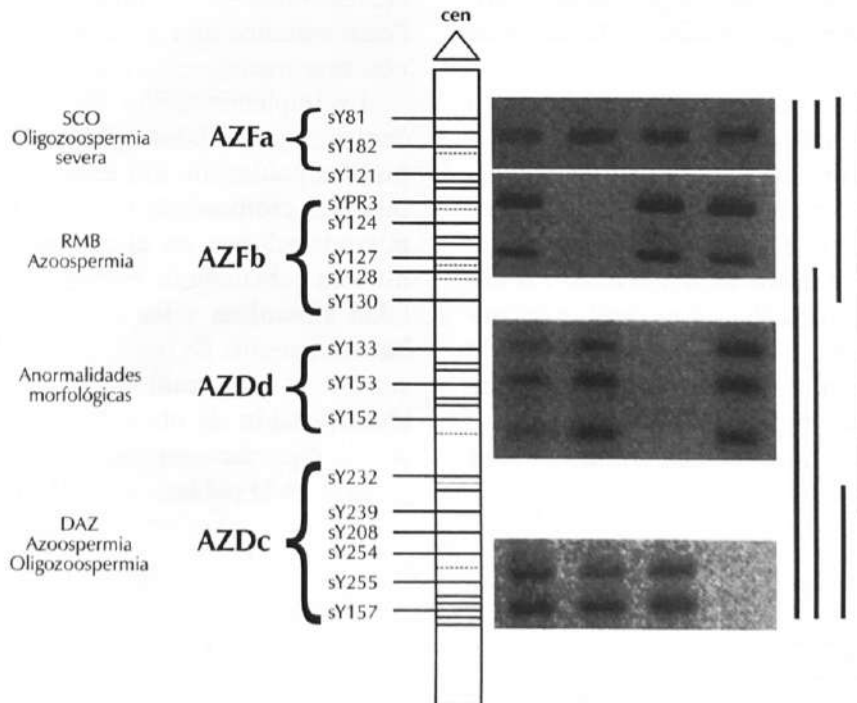
microdeleciones encontrada en pacientes con azoospermia fue de 13.9 % (5/36), mientras que en los oligozoospermicos no se encontraron microdeleciones. La presencia de microdeleciones fue muy variable en cada paciente, se encontraron desde una hasta cinco. Las zonas AZE mayormente afectadas fueron la c y d, seguidas de la zona b.

FIGURA 2



Prueba del estuche para detectar microdeleciones del cromosoma Y en un control fértil. Se pueden observar los diferentes STS amplificados a lo largo del brazo del cromosoma Y, en un control fértil (c) comparado con el positivo del estuche comercial (+) donde tampoco hay microdelección alguna (-) control negativo a la reacción.

FIGURA 3



Mapa representativo de algunos de los pacientes y sus correspondientes STS deletados. Se pueden observar las bandas faltantes en los geles que representan los STS deletados. A la izquierda se encuentra un mapa de las zonas AZFa, b y d y la posición de los STS analizados en este trabajo. Lo que se encuentra en negritas representa los STS que no se encontraron. A la derecha se encuentran unas barras en negro representando la parte del cromosoma Y que falta para cada uno de los pacientes.

CUADRO I Pacientes con STS deletados

Paciente	STS deletado	Zona AZF
26	sYPR3	b
	sY124	b
28	sY133	d
	sY153	d
	sY152	d
32	sY255	c
	sY157	c
40	sY128	b
45	sY254	c
	sY157	c
	sY255	c
	sY152	d
	sY153	d

Discusión

Los recientes estudios moleculares en varones infértiles realizados en distintas poblaciones han demostrado la importancia del componente genético en esta afección y principalmente las microdeleciones del cromosoma Y. Al no existir informes de análisis molecular en pacientes con infertilidad masculina en población mexicana, consideramos de gran importancia el análisis de microdeleciones en el cromosoma Y, para conocer la prevalencia de estas en nuestra población y particularmente en pacientes que acuden a Clínicas de Reproducción Asistida.

En este estudio no se encontraron alteraciones en cuanto al número y estructura de los cromosomas mediante el estudio de cariotipo en ninguno de los pacientes analizados. La frecuencia de anomalías cromosómicas encontrada en otras poblaciones, en pacientes azoospermicos va hasta 15 % y 4 % en los oligozoospermicos. En hombres fértiles es posible encontrar alteraciones hasta en 1.6 %.¹⁸⁻²⁰ Este hallazgo no lo pudimos comprobar en nuestra población debido a que usamos DNA de un banco previamente formado de pacientes fértiles y no se contaba con muestras para realizarles un cariotipo.

Desde que se conoce la presencia del factor azoospermico (AZF) se ha realizado una variedad de estudios en diferentes poblaciones para tratar de dilucidar el papel que juega en los pacientes infértiles. El análisis de esta zona se realiza mediante la presencia de STS los cuales nos permiten analizar la presencia de microdeleciones en el cromosoma Y. La prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con oligozoospermia varía desde 0 a 4.3 %, dependiendo del estudio.¹¹⁻¹³ Los resultados obtenidos de los pacientes con oligozoospermia en este estudio (0 % de microdeleciones) son similares a lo informado con anterioridad para otras poblaciones.

En los pacientes con azoospermia analizados en este estudio la prevalencia de microdeleciones encontrada fue de 13.9 % (5/36). Esta es similar a lo informado, ya que la variabilidad de los estudios es amplia (7.8-21 %). Sin embargo, es importante recalcar que no tenemos una prevalencia anteriormente informada en nuestra población con la cual comparar. Esta amplia variabilidad se debe a la diferencia en la selección de los grupos estudiados, principalmente en lo referente a los criterios de exclusión, y de los STS utilizados en cada estudio.

En los pacientes con azoospermia se ha observado que las zonas AZFa-c afectadas son variables dependiendo del estudio.²¹ En este estudio se encontraron microdeleciones en las zonas AZFb y c, y no en la zona a. Pocos estudios han analizado la zona d, mientras que nosotros encontramos microdeleciones en esta zona.

La implementación de este estudio nos permite contribuir con datos epidemiológicos moleculares en nuestra población. Sin embargo, al no encontrar alteraciones cromosómicas y con la baja prevalencia de microdeleciones en el cromosoma Y encontrada en nuestra población de pacientes que asisten por infertilidad masculina y los cuales han sido estudiados exhaustivamente. Es importante aclarar que es necesario continuar con estudios que nos permitan el análisis e identificación de otros genes que estén involucrados con la espermatogénesis y la función reproductiva en general en la población mexicana. ♦

Referencias bibliográficas

1. Green ED, Waterston RH. The human genome project. Prospects and implications for clinical medicine. *JAMA* 1991; 266: 1966-75.
2. Mark V, Jarvi K. The genetics of male infertility. *J Urology* 1996; 156: 1245-57.
3. Wong WY, Thomas CMG, Merkus JMW, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RPM. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril* 2000; 73: 435-40.
4. Delhanty IDA, Harper J. Genetic Diagnosis before implantation. *BMJ* 1997; 315: 828-9.

5. Simpson JL. Genetic counseling and prenatal diagnosis. En Gabbe SG, Neibyl JR, Simpson JL, Editores. *Obstetrics normal and problem pregnancies*, 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1996: 215-48.
6. Krausz C, Mc Elreavey K. Y chromosome and male infertility. *Front Biosci* 1999; 15: 4 E1-8.
7. Van der K, Montag M, Pescka B, Leygraaf J, Schwanitz G. et al. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletions screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mole Hum Reprod* 1997; 3: 699-704.
8. Kent-First M, Muallem A, Schultz J, Pryor J et al. *Mol Reprod Dev* 1999; 53: 27-41.
9. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K, Cooke HJ. et al. Polymerase chain reaction screening in Y chromosome deletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 775-9.
10. Volrath D, Footh S, Hilton A et al. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258: 52-9.
11. Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, de Kretser DM, Baker HW, McLachlan RI et al. Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged-site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1347-52.
12. Kim SW, Kim KD, Paick JS. Microdeletions within the azoospermia factor subregions of the Y chromosome in patients with idiopathic azoospermia *Fertil Steril* 1999; 72: 349-53.
13. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2001; 22: 226-39.
14. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joys H et al. High fertilization and implantation rates intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; 8: 1061-6.
15. Testart J, Rolet F, Bami C et al. Spermatic injection into human oocytes II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1996; 11: 780-3.
16. Meschede D, De Geyter C, Niesch E, Horst J. Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995; 10: 2880-6.
17. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A et al. Microdeletions in the Y-chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 534-9.
18. Pandiyan N, Jequier AM. Mitotic chromosomal anomalies among 1210 infertile men. *Hum Reprod* 1996; 11: 2604-8.
19. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001; 76: 479-84.
20. Kleiman SE, Yogev R, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod* 1999; 14: 33-8.
21. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods. *Hum Reprod* 16: 1543-7.



Lesiones escamosas intraepiteliales en pacientes VIH seropositivas. Su frecuencia y asociación con factores de riesgo para neoplasia cervical

Ángel Emilio Suárez Rincón,¹ Eduardo Vázquez Valls,² Manuel Ramírez Rodríguez,³ Héctor Montoya Fuentes,⁴ María de la Paz Covarrubias Rodríguez,⁵ José Sánchez Corona⁴

Resumen

Objetivo. Determinar la prevalencia de lesiones escamosas intraepiteliales (LEI), y su asociación con factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical, en pacientes VIH seropositivas. **Material y método.** Se realizó un estudio transversal que incluyó 50 pacientes VIH seropositivas conocidas quienes fueron sometidas a un interrogatorio dirigido a factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical. Se llevó a cabo toma de citología cervical y evaluación colposcópica del tracto genital inferior con toma de biopsia(s) dirigida(s). Se investigó la presencia de ADN-VPV por medio de reacción en cadena de la polimerasa y se cuantificaron los títulos de linfocitos T CD4 y CD8. Se formaron dos grupos para su comparación de acuerdo con la presencia o ausencia de lesión cervical. **Resultados.** La edad promedio fue de 36 ± 9.3 años con rango de 20 a 61 años, 26% no se habían realizado nunca citología cervical y en las que sí tenían, el promedio de tiempo desde la última fue de 33 meses (1-130 meses). La transmisión sexual del VIH fue la vía de adquisición en 72% de los casos y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección hasta el momento de la evaluación para el presente estudio fue de 40.6 ± 33.5 meses. En 64% de los casos ($n = 32$) se detectó ADN-VPV y en 42% se identificó coinfección con más de un tipo de VPH, y los tipos más frecuentes fueron 16 y 31. Se diagnosticó lesión cervical en 52% de los casos, 18% fueron de alto grado y 34% de bajo grado. Al comparar los factores de riesgo para neoplasia cervical y el recuento de linfocitos entre el grupo I (con LEI, $n = 26$) y el grupo II (sin LEI, $n = 24$), en los únicos que se encontró diferencia significativa fue la presencia de AND-VPV y la coinfección con más de un tipo de VPH, que fueron más frecuentes en el grupo 1. La transmisión sexual del VIH también fue más frecuente en el grupo 1. Se diagnosticó la presencia de lesiones sincrónicas en vagina y vulva en 20% y 12% de los casos, respectivamente. **Conclusiones.** Existe una prevalencia alta de positividad para ADN-VPV y de LEI en pacientes VIH seropositivas, que las identifica con un mayor riesgo de desarrollar cáncer cervical invasor, por lo que es importante desarrollar estrategias adecuadas para su detección, diagnóstico, manejo y seguimiento. ✧

Palabras clave: lesiones escamosas intraepiteliales, VIH, neoplasia cervical

(Suárez Rincón AE, et al. Lesiones escamosas intraepiteliales en pacientes VIH seropositivas. Su frecuencia y asociación con factores de riesgo para neoplasia cervical. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 32).

Centro Médico Nacional de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco.

¹Clínica de Colposcopia y Patología del Tracto Genital Inferior. Hospital de Ginecología y Obstetricia. ²Laboratorio de Inmunodeficiencias y Retrovirus Humanos. Centro de Investigación Biomédica de Occidente. ³Servicio de Infectología.

Hospital de Especialidades. ⁴División de Medicina Molecular. Centro de Investigación Biomédica de Occidente.

⁵Departamento de Patología. Hospital de Especialidades.

53 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Segundo Lugar de Investigación Clínica

Objective. Determining the prevalence of squamous intraepithelial lesions (SIL), and their association with known cervical neoplasia risk factors in seropositive HIV female patients. **Materials and methods.** A transversal study including 50 seropositive HIV female patients was carried out. The patients were interrogated concerning known cervical neoplasia risk factors. Cervical cytology tests and colposcopic evaluations of the lower genital tract, with directed biopsies, were carried out. The presence of HPV-DNA was investigated using the polymerase chain reaction and CD4 and CD8 T lymphocyte titers were determined. Two comparison groups were formed, in accordance to the presence or absence of cervical lesions. **Results.** Average age was 36 ± 9.3 years, ranging from 20 to 61 years, 26% had never submitted to a cervical cytology test, and an average of 33 months (1-130 months) had elapsed after the last test of those who had. HIV transmission had been sexual in 72% of the cases, and the period of time elapsed since the infection was diagnosed and until the patients were evaluated for this study was of 40.6 ± 33.5 months. HPV-DNA was detected in 64% ($n = 32$) of the patients, and co-infection with more than one HPV was detected in 42% of them, with the 16 and 31 types being the most frequent. A cervical lesion was diagnosed in 52% of the cases, 18% being of high degree and 34% of low degree. When risk factors for cervical neoplasia and lymphocyte titers were compared between group I (with SIL, $n = 26$), and group II (without SIL, $n = 24$), the only significant differences found were the presence of HPV-DNA and the co-infection with more than one type of HPV, which were more frequent in group I. Sexual transmission of HIV was also more frequent in group I. The presence of vaginal and vulvar synchronous lesions was determined in 20% and 12% of the cases, respectively. **Conclusions.** There is a high prevalence of positive DNA-HPV and SIL in seropositive HIV patients, which pose them in a higher risk of developing invasive cervical cancer. Thus, creating adequate strategies for the detection, diagnosis, management, and follow-up of these patients is of the utmost importance.

Key words: squamous intraepithelial lesions, HIV, cervical neoplasia.

(Suárez Rincón AE, et al. Squamous intraepithelial lesions in seropositive HIV female patients. Their frequency and association with cervical neoplasia risk factors. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 32).

Introducción

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) está etiológicamente asociada con el cáncer cervicouterino (CaCu) y su precursor, la lesión escamosa intraepitelial (LEI).^{1,2} En lesiones asociadas a VPH, el estado inmunológico juega un papel importante en la evolución de estas lesiones, puesto que se ha demostrado que durante estados de inmunidad alterada hay altos índices de infección por VPH y neoplasia cervical.^{3,5} Halpert en 1986 informa infección por VPH en 17.5% y neoplasia genital en 9.5% de pacientes trasplantadas inmunosuprimidas lo cual representa un aumento de 17 y 9 veces, respectivamente, a la encontrada en población apareada inmunocompetente.⁴

La inmunodeficiencia celular, congénita o adquirida, predispone al desarrollo de neoplasias malignas principalmente las asociadas a virus oncogénicos tales

como linfoma no Hodgkin-virus Epstein Barr, sarcoma de Kaposi-citomegalovirus, y cáncer anogenital-VPH.⁶ La infección por virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial y comparte factores de riesgo con otros agentes transmitidos por vía sexual, principalmente el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).^{3,7,8}

Varios estudios han demostrado una asociación entre la infección por VIH e infección por VPH.⁸⁻¹⁰ En mujeres VIH seropositivas, la frecuencia de detección de ADN-VPH se ha informado consistentemente más alta que en VIH seronegativas, como se esquematiza en el cuadro I.

También la frecuencia de LEI (confirmada histológicamente) se ha informado con mayor frecuencia en mujeres VIH seropositivas contra seronegativas, por ejemplo: Wright (1994) informa 20% contra 4.2%, Sun (1995) 31.7% contra 9.4%, Volkow (2001) 42% contra 26%.

CUADRO I Prevalencia de infección por virus del papiloma humano

Autor (año)	Pacientes VIH positivos (%)	Pacientes VIH negativos (%)
Vermund 1991	53	22
Wright 1994	61	36
Sun 1995	60	36
Massad 1999	63	30
Palefsky 1999	63	30
Moscicki 2000	77	54
Ellerbrock 2000	54	32
Volkow 2001	69	28

Debido al aumento en la incidencia de infección por VIH en mujeres, varios estudios se han enfocado en las manifestaciones ginecológicas de la enfermedad, incluido el CaCu, en el estado de inmunocompromiso.^{14,17} Un estudio acerca de la prevalencia e incidencia de problemas ginecológicos en mujeres VIH seropositivas reveló que las alteraciones más frecuentes fueron las relacionadas con el VPH (verrugas genitales, citología cervical anormal e infección con VPH oncogénicos).¹⁷

A nivel mundial está bien documentada una prevalencia elevada (17-50 %) de LEI en mujeres infectadas con VIH,^{7,9,11-16} así como frecuencias elevadas tanto de persistencia como de recurrencia después de tratamientos estándar (55-62 % en VIH seropositivas contra 10-18 % en seronegativas),^{3,18-20} como frecuencia elevada (13-37 %) de lesiones asociadas en vagina y vulva,^{3,21,22} y progresión más frecuente y rápida a lesiones más avanzadas.^{3,20,23,24}

El grado de inmunosupresión cuantificado por el recuento y porcentaje de células T parece estar relacionado con la presencia, seriedad y evolución de la infección por VPH y LEI. Esta asociación ha sido descrita por algunos,^{7,9,12,14} pero no todos los investigadores.^{13,16}

Es por estos hallazgos que en 1993 el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta introdujo la LEI de alto grado (displasia moderada, displasia severa y cáncer *in situ*) y el CaCu como enfermedades asociadas a SIDA en pacientes VIH seropositivas, dentro de las categorías B y C respectivamente.²⁵

En países desarrollados existen muchos informes en relación con la asociación entre VIH y neoplasia cervical, países donde el VIH-SIDA es una enfermedad importante pero el CaCu no es un problema de salud pública; pero en países subdesarrollados, con alta morbilidad y mortalidad por CaCu, no hay mucha información al respecto. En México, el CaCu es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer²⁶ y la infección por VIH está creciendo rápidamente entre las mujeres.²⁷

Una revisión sobre VIH-SIDA en mujeres mexicanas describe un incremento tanto en el porcentaje de

casos nuevos (desde 3 % en 1985 hasta 14 % en 1991) como en la frecuencia de transmisión heterosexual (desde 0 % en 1986 hasta 64 % en 1994), siendo el grupo de edad más afectado el comprendido entre los 20-49 años con 60 % de casos.²⁷

La tendencia mundial es hacia el aumento de los casos de infección con VIH, por lo que habrá cada vez más mujeres VIH seropositivas, aumentando a su vez las pacientes con infección por VPH, LEI y CaCu que requerirán ser detectadas, diagnosticadas y manejadas. Esto se vuelve más importante debido a la mejoría en la supervivencia observada por adelantos en la terapia antirretroviral.

Por el impacto en la Salud Pública que representan estas dos enfermedades (VPH-CaCu y VIH-SIDA) en nuestro medio en forma independiente, y debido a que el CaCu es un problema serio en la mujer mexicana con aparente buen estado inmunitario se vuelve importante estudiar el papel del inmunocompromiso secundario a la infección por VIH en la presencia y desarrollo de las lesiones asociadas a VPH.

Es por esto que se realizó el presente estudio con el objetivo de determinar la prevalencia de LEI y su asociación con factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical, en pacientes VIH seropositivas.

Objetivos

General

Determinar la prevalencia de LEI, y su asociación con factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical, en pacientes VIH seropositivas.

Particulares

1. Conocer la prevalencia de LEI en pacientes VIH seropositivas.
2. Determinar, por medio de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), la frecuencia de positividad pa-

ra ADN-VPH y los tipos virales más frecuentes, en el cuello uterino de estas pacientes.

3. Comparar la presencia o ausencia de LEI, en relación con la presencia de factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical.
4. Comparar la presencia o ausencia de LEI en relación con la presencia y tipo de ADN-VPH y recuento de linfocitos T CD4 y CD8.

Material y método

Previo aprobación por el comité de investigación local se realizó en forma prospectiva el presente estudio transversal comparativo. Los criterios de selección fueron los siguientes: Criterios de inclusión. 1. Ser paciente VIH seropositiva conocida y bajo control periódico por el Servicio de Infectología del Hospital de Especialidades entre marzo de 1998 y diciembre de 1999. 2. Edad de 18 años o más. 3. Haber iniciado actividad sexual. Criterios de no inclusión. 1. Antecedente de diagnóstico o manejo por LEI o CaCu. 2. Histerectomía total previa. 3. Condiciones generales que les impidan acudir a la Clínica de Colposcopia.

A cada paciente se le realizó un cuestionario dirigido que incluyó preguntas como edad, nivel de escolaridad, estado civil, edad del primer coito, número de embarazos y partos, número de parejas sexuales, edad al primer embarazo, tabaquismo, transfusiones previas, citologías cervicales previas, tiempo desde la última citología cervical, tiempo desde el diagnóstico de la infección por VIH, posible mecanismo de adquisición del VIH, y algunas características de la pareja sexual como ser o haber sido migrante de Estados Unidos, portador del VIH o fallecimiento por SIDA.

Se obtuvo una citología cervical con muestreo endocervical (cepillo) y ectocervical (espátula de Ayre) y después se realizó una evaluación colposcópica del tracto genital inferior en forma usual. Las anomalías

des colposcópicas cervicales se dividieron en dos categorías, lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado. Se tomó biopsia de las áreas de sospecha colposcópica. Si no se observaban áreas sospechosas, se tomó una biopsia al azar de la zona de transformación. Los hallazgos citológicos e histológicos fueron clasificados de acuerdo con la OMS. (infección por VPH, displasia leve, moderada, y severa y cáncer *in situ*). Los informes fueron a su vez reclasificados de acuerdo con el sistema de Bethesda como LEI de bajo grado (infección por VPH y displasia leve) y LEI de alto grado (displasia moderada, displasia severa y cáncer *in situ*). Los especímenes citológicos e histológicos fueron interpretados por un solo patólogo.

Se tomaron muestras sanguíneas para cuantificación de linfocitos T CD4/CD8. Se realizó primero separación de los linfocitos mediante gradientes de concentración con Ficoll y Angio-Conray para después hacer marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 (culter clone™ T4-FITC y culter clone™ T8-FITC). Incubación a 37°C por 30 minutos, lavado y fijación en una mezcla de glicerol/etilenglicol 50/50, observación en microscopio de fluorescencia y finalmente cuantificación de los linfocitos T CD4 y CD8.²⁸

Para la detección de ADN-VPH, la fuente del ADN fueron células exfoliadas del cuello uterino obtenidas por cepillado endocervical. La extracción del ADN fue hecha por método de proteinasa K modificado de uno descrito por Wright y Manos.²⁹ La cantidad y pureza del ADN extraído se estiman mediante un método espectrofotométrico. Con el uso de los iniciadores CpI y CPIIG se realizó amplificación de una secuencia consenso localizada en el marco de lectura abierto E1 de diferentes VPH, que incluye a los tipos 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, y 58, entre otros. Las condiciones para un volumen de reacción de 20 µL se muestran en el cuadro II.

Para los controles y muestras se utilizaron 8.3 µL de coctel de amplificación + 9.7 µL de H₂O + 20 µL

CUADRO II Condiciones para un volumen de reacción de 20 µL

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen de reactivo (µL)
Buffer RCP	10X	1X	2
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.6
Iniciador CplIG	10 pmol/µL	1 pmol/µL	2
Iniciador Cpl	10 pmol/µL	1 pmol/µL	2
DATP	10 mM	0.2 mM/µL	0.4
DCTP	10 mM	0.2 mM/µL	0.4
DGTP	10 mM	0.2 mM/µL	0.4
DTTP	10 mM	0.2 mM/µL	0.4
Taq-pol	5 U/µL	2.5 U/100 µL	0.1

de ADN; para el blanco se utilizaron 8.3 µL de coc-tel + 11.7 µL de H₂O. La amplificación se realizó con el programa PVHUNI que comprende 32 ciclos como sigue:

Paso 1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
Paso 2	94°C	30 seg	Desnaturalización
Paso 3	51°C	30 seg	Alineamiento
Paso 4	72°C	1 min	Extensión
Paso 5			Ir al paso 2, por 32 veces
Paso 6	72°C	10 min	Extensión final prolongada
Paso 7	4°C	Indefinido	Preservación
Paso 8			Fin del programa

El fragmento resultante de 188 pares de bases (pb) fue evidenciado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Se recuperaron los fragmentos de 188 pb mediante su escisión del gel. Subsecuentemente, el producto amplificado y recuperado se mezcló e incubó con la enzima de restricción *Rsa I* que reconoce la secuencia 5' GT/AC 3', la cual está en al menos un sitio de los VPH más comunes. Después de la incubación se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para observar las bandas resultantes de la digestión del fragmento original de 188 pb y comparar con los mapas de restricción esperados por cada tipo viral:

VPH 6	Fragmentos esperados	57, 21 y 110 pb
VPH 11	Fragmentos esperados	35, 43 y 110 pb
VPH 16	Fragmentos esperados	30, 117, 23 y 18 pb
VPH 18	Fragmentos esperados	170 y 18 pb
VPH 31	Fragmentos esperados	52, 118 y 18 pb
VPH 33	Fragmentos esperados	83, 7, 80 y 18 pb
VPH 35	Fragmentos esperados	30, 140 y 18 pb
VPH 51	Fragmentos esperados	30, 117 y 41 pb

Se utilizaron controles negativos y positivos en cada amplificación para asegurar la no contaminación de las muestras en los diferentes pasos del procedimiento.

La frecuencia de LEI e infección por VPH y tipos específicos fue expresada como porcentajes. Para su comparación se formaron dos grupos de acuerdo con la presencia de LEI (grupo I con LEI, grupo II sin LEI). Se usaron Chi cuadrada y prueba exacta de Fisher para comparar proporciones y ANOVA para comparar promedios, cuando estaba indicado. La significancia estadística de las pruebas fue considerada a un nivel de $p < 0.05$.

En el periodo de estudio el censo nominal de pacientes VIH seropositivos era de 422 casos, 348 hombres y 74 mujeres, para una razón hombre/mujer de 4.7/1. Se logró entrevistar a 62 de las 74 pacientes del censo nominal de casos, se les explicó el objetivo del estudio y se obtuvo consentimiento informado. No se incluyeron cinco por tener antecedente de histerectomía total, cuatro por no ser posible su traslado a la Clínica de Colposcopia para su valoración debido a sus condiciones generales, dos más por LEI conocida y bajo control por la Clínica de Colposcopia y una por antecedente de cáncer cervicouterino radiado, por lo que se presentan y analizan los datos de 50 casos.

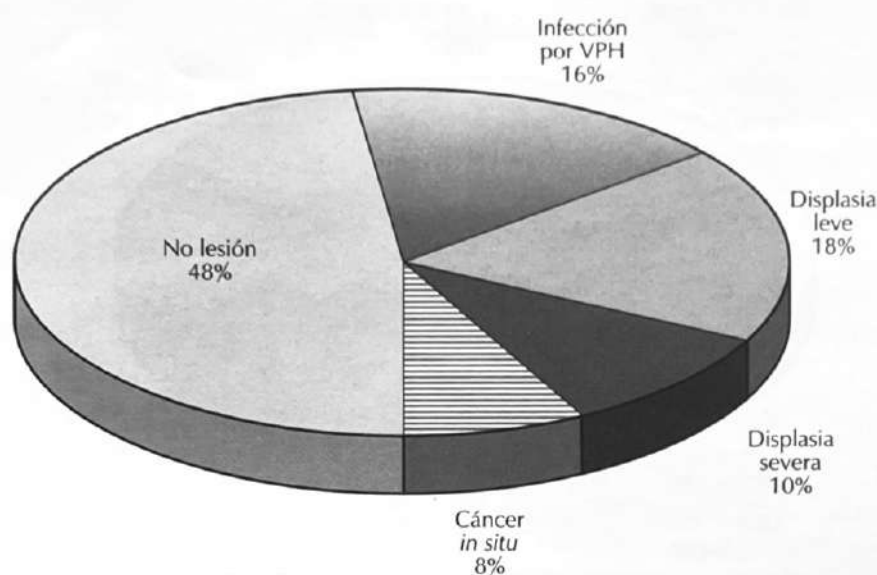
La edad promedio fue 36.3 ± 9.3 años (20-61 años) y el nivel de escolaridad 9.06 ± 3.5 años (0-16). El estado civil fue casada en 20 casos (40%) y viuda en 19 pacientes (38%). En total, 26% de pacientes eran fumadoras, el tiempo desde la última citología cervical fue de $33.2 \pm 1-130$ meses y 26% no tenía citología cervical previa. La edad del primer coito fue a los 19.6 ± 4.7 años (12-35 años), el número de embarazos 0-17, el número de partos vaginales 0-13, la edad del primer embarazo fue en promedio a los 21.2 ± 4.4 años (13-35 años), el número de parejas sexuales tuvo un rango de 1-10 (2.2 ± 1.6). El tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por VIH fue 40.6 ± 33.5 meses; pareja VIH seropositiva se informó en 37 casos (74%), 11 habían sido migrantes a Estados Unidos y 20 habían fallecido de SIDA.

La transmisión sexual fue la vía más frecuente de adquisición del VIH (72%), en 22% de los casos estuvo asociada a transfusiones y en tres mujeres la fuente de la infección fue desconocida.

La prevalencia de LEI fue 52% (26 casos), 18% fueron LEI de alto grado y 34% de bajo grado (Figura 1). Al comparar los factores de riesgo para neoplasia cervical entre el grupo I (Con LEI, $n = 26$) y el grupo II (sin LEI, $n = 24$), los únicos factores significativos fueron la presencia de ADN-VPH y la coinfección con más de un tipo de VPH, que fueron más frecuentes en el grupo I. La transmisión sexual del VIH también fue más frecuente en el grupo I. No se encontraron diferencias significativas entre la presencia de LEI y el tiempo desde el diagnóstico de la infección por VIH, la pareja infectada con VIH, pareja fallecida por SIDA, ni pareja migrante a Estados Unidos (Cuadro III).

Treinta y dos pacientes (64%) fueron positivas para ADN-VPH, en 42% ($n = 21$) se detectó más de un tipo de VPH (Figura 2). Los tipos de VPH 16 y 31 fueron los más frecuentes (Figura 3).

FIGURA 1

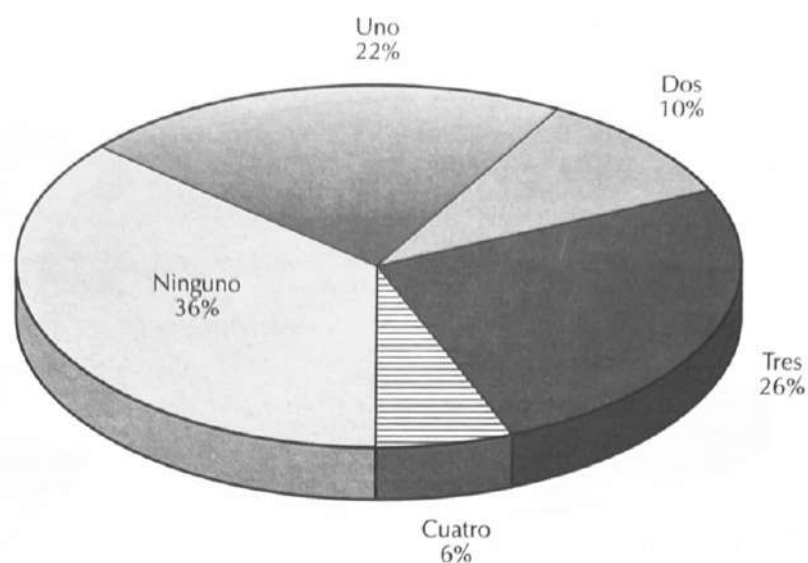


Presencia de lesión cervicouterina.

CUADRO III Factores de riesgo para neoplasia cervical

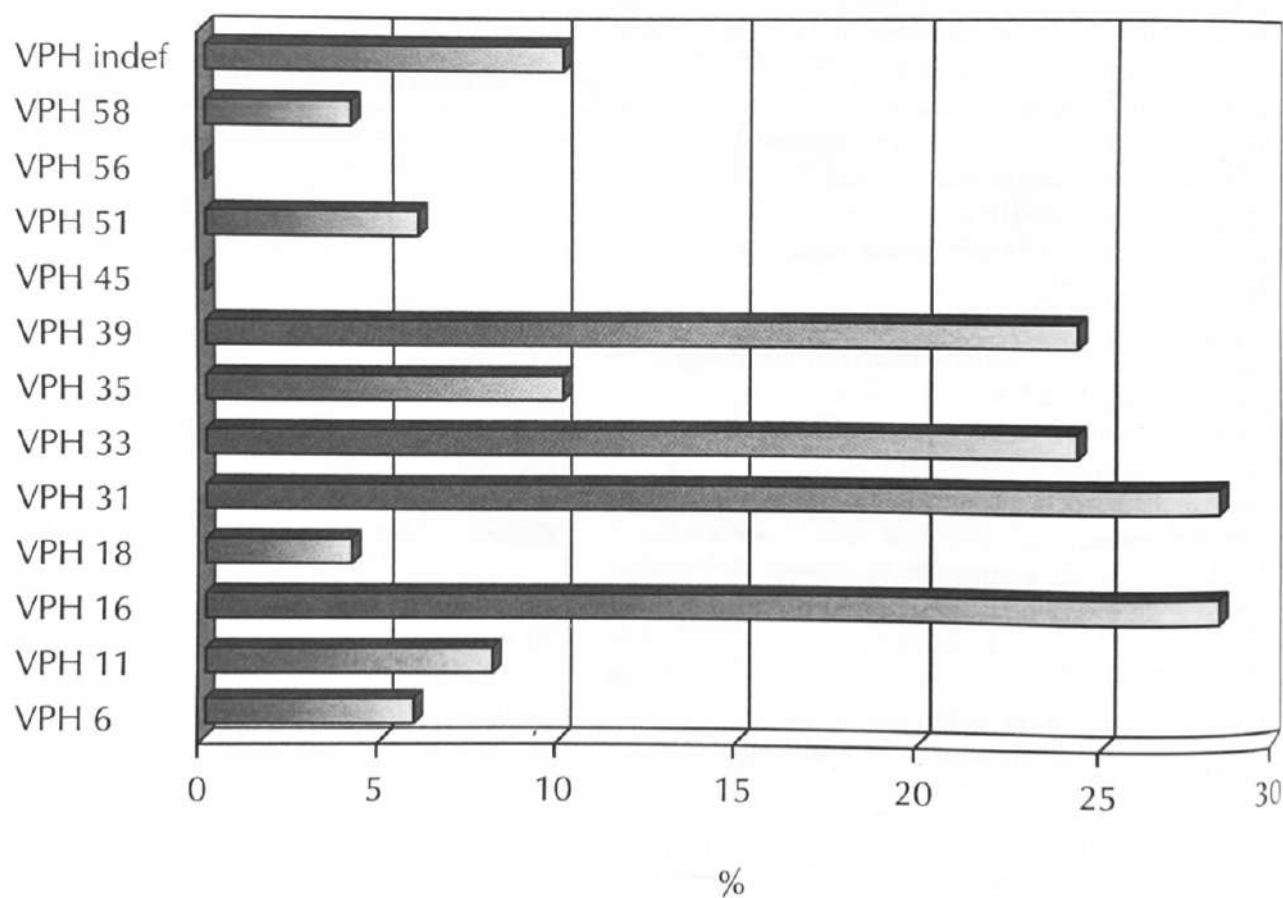
	Grupo 1 Con lesión cervical n = 26	Grupo II Sin lesión cervical n = 24	P
Edad (años)	35.4 ± 9.0 (22-61)	37.2 ± 9.7 (20-60)	NS
Escolaridad (años)	9.0 ± 3.6 (2-16)	9.1 ± 3.5 (0-15)	NS
Tabaquismo	6 (23%)	7 (29%)	NS
No citología cervical previa	7 (14%)	6 (12%)	NS
Tiempo de la última citología cervical (meses)	31.9 ± 37.3 (1-120)	34.5 ± 29.3 (10-130)	NS
Edad del primer coito (años)	19 ± 3.6 (14-32)	20.3 ± 5.7 (12-35)	NS
Número de embarazos	3.4 ± 3.3 (0-17)	2.9 ± 2.2 (0-9)	NS
Número de partos	2.4 ± 2.7 (0-13)	1.9 ± 2.4 (0-8)	NS
Edad del primer embarazo (años)	20.7 ± 4.0 (14-34)	21.7 ± 4.8 (13-35)	NS
Número de compañeros sexuales	2.3 ± 1.9 (1-10)	2.0 ± 1.3 (1-5)	
Pareja migrante a EUA	6 (25%)	5 (22.7%)	NS
Pareja VIH seropositivo	22 (84%)	15 (65.2%)	NS
Pareja fallecida por SIDA	10 (38.5%)	10 (43.5%)	NS
Adquisición sexual del VIH	22 (84.6%)	14 (58.3%)	0.04
Tiempo del diagnóstico del VIH	35.2 ± 39.3 (10-138)	46.5 ± 25.3 (3-92)	NS
Presencia de ADN-VPH	22 (85%)	10 (42%)	0.001
Coinfección con más de un tipo de VPH	15 (57.7%)	7 (29.2%)	0.04

FIGURA 2



Frecuencia de positividad para ADN-VPH y de coinfecciones.

FIGURA 3



Tipos de VPH detectados.

CUADRO IV Recuento de leucocitos

	Total n = 43	Grupo I n = 23	Grupo II n = 20	p
Leucocitos totales	5,286 ± 2,572 (1,525-13,500)	6,026 ± 3,059 (2,475-13,500)	4,433 ± 1,534 (1,525-6,950)	NS
Linfocitos totales	2,073 ± 1,055 (630-4,774)	2,369 ± 1,095 (742-4,774)	1,931 ± 918 (630-3,835)	NS
% linfocitos	40.15 ± 12.96 (10-65)	40.7 ± 11.1 (23-61)	39.5 ± 15.1 (10-65)	NS
Linfocitos CD4	510 ± 318 (38-1,641)	554 ± 313 (128-1357)	460 ± 323 (38-1,641)	NS
% linfos CD4	25.3 ± 8.47 (11.5-50)	24.1 ± 7.8 (12.5-43.6)	26.8 ± 9.1 (11.5-50)	NS
Linfocitos CD8	734 ± 417 (133-1,667)	834 ± 436 (260-1,667)	619 ± 370 (133-1,617)	NS
% linfocitos CD8	37.16 ± 11.44 (11.76-60.7)	37.3 ± 12.3 (11.8-60.7)	37.0 ± 10.6 (12.6-53)	NS
Relación CD4/CD8	0.757 ± 0.36 (0.28-2.01)	0.715 ± 0.303 (0.28-1.4)	0.805 ± 0.42 (0.3-2.01)	NS

Se realizó recuento de linfocitos en 43 casos, 23 del grupo I y 20 del grupo II. El cuadro IV muestra el recuento de leucocitos, linfocitos totales y linfocitos CD4 y CD8 en todos los casos y por grupos, en la que se observa que no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El tiempo transcurrido entre la evaluación ginecológica y el recuento de linfocitos fue de 1.86 ± 2.11 meses.

En relación con la presencia de lesiones asociadas en vagina y/o vulva, éstas se encontraron en 10 (20%) y 6 (12%) de los casos respectivamente, las cuales incluyen tres lesiones de alto grado en vagina y tres en vulva (Cuadro V).

Discusión

La infección por VIH es probablemente la causa más importante de inmunosupresión en el mundo y la diseminación del virus está en aumento. En todo el mun-

do se informa un incremento en el número de casos en mujeres debido a diversos factores que determinan mayor vulnerabilidad a esta infección, con respecto a los varones. La seroprevalencia es variable y depende del grupo social estudiado.

El mecanismo de adquisición de la infección por VIH más frecuente en la mujer en nuestro medio en los últimos años es la vía sexual, que se refiere en 64% de los casos nuevos.²⁷ En nuestro estudio esto aconteció en 72% (n = 36) de los casos, y 64% (n = 32) tenían sólo 1-2 parejas sexuales, lo cual enfoca la atención al papel del varón, más aún si se considera que 74% eran seropositivos.

Cuando la infección del VIH en mujeres ha sido generalizada, se han diagnosticado más casos de infección por VIH y se han vuelto más evidentes algunos problemas ginecológicos específicos. Las enfermedades ginecológicas más frecuentes son las relacionadas con VPH (verrugas genitales, citología cervical anormal e infección con VPH oncogénicos).¹⁷

CUADRO V Lesiones sincrónicas en vagina y vulva

	Vagina		Vulva
Inf. VPH	5 (10%)	Inf. VPH	2 (4%)
NIVa I	2 (4%)	NIV I	1 (2%)
NIVa II	3 (6%)	NIV II	2 (4%)
NIVa III	0	NIV III	1 (2%)
Total	10 (20%)	Total	6 (12%)

NIVa = Neoplasia intraepitelial vaginal, NIV = Neoplasia intraepitelial vulvar

Como ya se mencionó, las mujeres infectadas con VIH tienen una prevalencia mayor de infección por VPH que las mujeres sin VIH y, dado que la infección por VPH está fuertemente asociada con LEI y CaCu, un alto porcentaje de mujeres VIH seropositivas están en riesgo de desarrollar estas enfermedades, lo cual pone de manifiesto un estudio al calcular la probabilidad de LEI de 0.49 cuando ambos virus están presentes, de 0.15 cuando un solo virus está presente y de 0.03 cuando ambos virus están ausentes.¹⁴

Tanto el VIH como el VPH son virus transmitidos sexualmente con factores de riesgo en común, por lo tanto en sitios donde las dos infecciones están presentes, una mujer estará en riesgo para ambas, por lo que se les debe tener en mente para su detección. Esto en relación a que, a pesar de haber transcurrido en promedio 40 meses desde el diagnóstico de la infección por VIH, 78 % en nuestros casos no tenían citología cervical previa o habían transcurrido más de 12 meses desde de la última citología.

En nuestro estudio el ADN-VPH fue detectado en 64 % de los casos, y los tipos virales 16 y 31 fueron los más frecuentes. A menudo ocurren infecciones con tipos múltiples de VPH en mujeres VIH seropositivas, que van desde 29 % hasta 51 % de los casos.^{7,9,13,14,30,31} En este estudio documentamos una alta prevalencia (42 %) de coinfección con más de un tipo de VPH.

La detección del VPH puede variar con el tiempo, aun en intervalos cortos de estudio, por lo que el significado de la detección en un momento determinado es incierto, lo anterior es debido a las fluctuaciones con el tiempo en la carga viral y a que muchos casos de infección por VPH son transitorios.^{8,32,33} En un estudio de seguimiento para determinar la prevalencia de infección por VPH, Sun y colaboradores detectaron, al inicio del seguimiento, ADN-VPH en 56 % de mujeres VIH positivas contra 31 % en mujeres VIH negativas; después de cuatro estudios seriados la prevalencia acumulada fue de 83 % y 62 %, respectivamente, en VIH positivas y VIH negativas; se encontró infección persistente en 24 % y 4 %, respectivamente y por último, se identificó infección persistente con VPH de alto riesgo en 20 % y 3 % de los casos, respectivamente.⁸

Por otro lado, ha sido aceptado que la infección persistente con tipos de VPH de alto riesgo tiene un papel clave en el desarrollo de LEI y CaCu.^{1,34} Además, tanto la presencia del VIH como los niveles elevados de inmunosupresión son factores importantes de la infección persistente por VPH.^{3,8,35} Entonces, el concepto de que la infección por VPH es adquirida a edades tempranas y después eliminada o suprimida a nivel en el cual ya no puede ser detectada entre las mujeres en la

población general, es muy diferente entre mujeres infectadas con VIH.^{14,32,35}

Dado que el uso de agentes antirretrovirales potentes y regímenes profilácticos efectivos contra patógenos oportunistas está teniendo un impacto en prolongar la supervivencia de individuos infectados con VIH, las LEI y el CaCu pueden emerger como una complicación, a menos que las mujeres seropositivas sean identificadas y se realice un adecuado tamizaje cervical, principalmente en países subdesarrollados donde el CaCu es un verdadero problema de salud pública y el tamizaje citológico no ha sido efectivo.³⁶

Se ha cuestionado la capacidad de la citología cervical para detección de patología cervical en mujeres infectadas con VIH, debido a un elevado índice de falsos negativos.^{21,30,37-40}

Sin embargo, la aparente sensibilidad disminuida no ha sido observada por todos los investigadores.^{12,41} Debido a estos hallazgos contradictorios, el método óptimo de tamizaje para LEI o CaCu en estas pacientes es aún incierto. En 1993, el CDC recomendó para el tamizaje, citología cervical anual después de dos citologías sucesivas adecuadas y normales hechas con seis meses de diferencia,⁴² además un estudio sobre beneficio en la esperanza de calidad de vida apoya esta conducta en Estados Unidos.⁴³ En nuestro estudio encontramos lesión cervical confirmada histológicamente en 8 de 10 pacientes con citología normal en los 12 meses previos, lo cual llama la atención por la elevada frecuencia de resultados falsos negativos.

En México, el tamizaje citológico puede tener serias limitaciones en mujeres infectadas con VIH, principalmente por el índice de falsos negativos informado en población general, que se calcula de 35 % en promedio,⁴⁴ y por la alta prevalencia de LEI en general (52 %), y de LEI de alto grado en particular (18 %), observada en nuestro estudio. Ante estas circunstancias una citología puede fallar en la detección de LEI en 18.2 % y de LEI de alto grado en 6.3 % de las pacientes tamizadas. Esto significa que dada la alta prevalencia de LEI en estas pacientes, aun un índice de falsos negativos similar al de la población general puede resultar en muchas LEI no detectadas, y la falla para identificar tempranamente LEI de alto grado puede tener serias consecuencias.

En nuestro estudio, pacientes con LEI no difieren significativamente de pacientes sin LEI con relación a la presencia de factores de riesgo tradicionalmente conocidos para neoplasia cervical incluyendo tabaquismo, parejas sexuales múltiples, edad del primer coito, paridad y el no tener citologías cervicales previas, hallazgo acorde con lo informado por otros autores,^{9,14,15,31} lo cual no permite discriminar, por factores de riesgo

para neoplasia cervical, pacientes VIH positivas con mayor riesgo de LEI/CaCu. Muchas de estas variables parecen actuar como subrogados del VPH cuando se usan métodos sensibles para la detección del ADN/VPH, como en este estudio donde las únicas variables independientes asociadas con LEI fueron la presencia de ADN-VPH y la coinfección con dos o más tipos de VPH. Tampoco se encontró asociación entre el recuento de linfocitos ni el nivel de CD4 contra la presencia de LEI o de ADN-VPH. Habría que considerar estos datos en función del tamaño de la muestra.

El hallazgo de 10 casos (20 %) de lesiones sincrónicas en vagina y de seis casos (12 %) en vulva enfatiza la naturaleza regional de estas lesiones y que no sólo es el cérvix el órgano blanco,

La presencia y severidad de las lesiones por VPH han sido asociadas a un aumento en el daño inmunológico.^{3,5,15} Mujeres infectadas con VIH y niveles bajos de linfocitos CD4 parecen portar el VPH en forma más frecuente y persistente que las infectadas con VIH pero con niveles normales de CD4.^{7,12,13,31,35} Sin embargo, no siempre se ha encontrado patología cervical con niveles crecientes de inmunosupresión,^{14,15,32} como sucedió en este estudio.

Debido a la elevada frecuencia de citologías cervicales anormales en mujeres VIH seropositivas, con la misma frecuencia estas pacientes requerirán la realización de colposcopia para afinar el diagnóstico. Por otro lado, debido a la alta prevalencia de LEI, y principalmente de LEI de alto grado, una citología "normal" tendrá un índice de falla muy elevado, por lo que una evaluación colposcópica rutinaria, aunada a la citología, como método inicial de tamizaje disminuiría la posibilidad de no identificar estas lesiones, lo que permitiría además realizar una evaluación de todo el tracto genital inferior y no sólo del cérvix.

Puesto que las características principales de las LEI en pacientes VIH seropositivas están definidas (frecuencia elevada de infección por VPH, de coinfección con más de un tipo de VPH y de infección con tipos virales de alto poder oncogénico; alta prevalencia de LEI, de LEI de alto grado y de lesiones sincrónicas en vagina y vulva; no asociación entre estas lesiones y los factores de riesgo para neoplasia cervical tradicionalmente conocidos ni con el recuento de linfocitos y recurrencias frecuentes posterior a cualquier manejo conservador), actualmente el problema clínico principal es el de identificar correctamente a las pacientes con LEI y prevenir la progresión de LEI a CaCu sin tratamientos repetidos, en el mayor número de años que la mujer vive hoy gracias al manejo antirretroviral. Los tratamientos conservadores repetidos pueden no sólo re-

sultar en estenosis y distorsión de la arquitectura cervical haciendo más difícil su evaluación y ocultando LEI de alto grado, sino que las complicaciones del tratamiento pueden ser más frecuentes en estas pacientes.

Por lo anterior, el seguimiento cuidadoso es primordial para la paciente con diagnóstico reciente de infección por VIH, para descartar fehacientemente la presencia de LEI en todo el tracto genital inferior, y más aún en las que ya se diagnosticó y manejó una lesión para identificar tempranamente una recurrencia y evitar la progresión a CaCu. Por las condiciones de esta problemática en nuestro país quizá no sea una buena medida tomar las recomendaciones de tamizaje del CDC y sea más prudente realizar citología y colposcopia inicial en todos los casos, y sólo después de colposcopia y citología normales, realizar vigilancia citológica exclusivamente.

Conclusiones

1. La vía de adquisición de la infección por VIH es la sexual en tres de cada cuatro mujeres estudiadas.
2. El tamizaje cervical en estas pacientes es subóptimo por no realización de citologías (78 % no tenían citología cervical o habían transcurrido más de 12 meses desde la última citología) y por la frecuencia elevada de resultados falsos negativos (se diagnosticó LEI en 51 % de las pacientes con citología previa normal).
3. La frecuencia de infección latente por VPH, determinada por RCP, es elevada (64 %) así como la coinfección con más de un tipo de VPH (42 %).
4. En pacientes VIH seropositivas la frecuencia de lesiones escamosas intraepiteliales cervicales confirmadas histológicamente es muy elevada (52 %) en comparación con lo observado en población general (< 5 %), así como también es alta la frecuencia de lesiones sincrónicas asociadas en vagina y vulva (20 y 12 %, respectivamente).
5. Entre los factores de riesgo conocidos para neoplasia cervical el único asociado con la presencia de LEI fue la presencia de ADN-VPH.
6. Es importante un adecuado tamizaje para patología preinvasora de todo el tracto genital inferior, y no sólo del cérvix, por lo que la citología como herramienta única de detección tiene un valor limitado en nuestro medio en pacientes VIH seropositivas, debido tanto a la frecuencia elevada de resultados falsos negativos, a la prevalencia elevada de LEI y a la no posibilidad de identificación de lesiones vaginales y vulvares.

Agradecimientos

Al Fondo de Fomento a la Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo. ♦

7. Por lo anterior, en nuestro medio posiblemente sea más adecuado realizar citología y colposcopia inicial en todas las pacientes VIH seropositivas, y sólo después de citología y colposcopia normales, realizar vigilancia citológica exclusivamente.

Referencias bibliográficas

1. Schiffman MH, Bauer HM, Iloover RN, Glass AG, Cadell DM, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-64.
2. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
3. Wright TC, Sun XW. Infección por virus del papiloma humano y neoplasias anogenitales en mujeres inmunodeficientes. *Clin Gynecol Obstet Temas Actuales* 1996; 4: 793-823.
4. Halpert R, Fruchter RG, Sedlis A, Butt K, Boyce JG, et al. Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 251-4.
5. Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, et al. Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* 1994; 57: 836-40.
6. Biggar RJ, Rabkin CS. The epidemiology of AIDS-related neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996; 10: 997-1010.
7. Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 226-36.
8. Sun XW, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, et al. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1997; 337: 1343-9.
9. Massad LS, Riestter KA, Anastos KM, Fruchter RG, Palefsky JM, et al. Prevalence and predictors of squamous cell abnormalities in Papanicolaou smears from women infected with HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 21: 33-41.
10. Sillman FH, Sedlis A. Anogenital papillomavirus infection and neoplasia in immunodeficient women. *Obstet Clin North Am* 1987; 14: 537-57.
11. Vermund SH, Kelley KF, Klein RS, Feingold AR, Schreiber K, et al. High risk of human papillomavirus infection and cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 392-400.
12. Wright TC, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Van Devanter N, Sun XW, and the New York Cervical Disease Study. Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected With Human Immunodeficiency Virus: Prevalence, Risk Factors, and Validity of Papanicolaou Smears. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 591-7.
13. Sun XW, Ellerbrock TV, Lungu O, Chiasson MA, Bush TJ, et al. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 680-6.
14. Moscicki AB, Ellenberg JH, Vermund SH, Holland CA, Darragh T, et al. Prevalence of and risks for cervical human papillomavirus infection and squamous intraepithelial lesions in adolescent girls. Impact of infection with human immunodeficiency virus. *Arch Ped Adolesc Med* 2000; 154: 127-34.
15. Ellerbrock TV, Chiasson MA, Bush TJ, Sun XW, Sawo D, et al. Incidence of cervical squamous intraepithelial lesions in HIV-infected women. *JAMA* 2000; 283: 1031-7.
16. Volkow P, Rubí S, Lizano M, Carrillo A, Villar-Compte D, et al. High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 27-31.
17. Minkoff H, Eisenberger-Matityahu D, Feldman J, Burk R, and Clarke L. Prevalence and incidence of gynecologic disorders among women infected with human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 824-36.
18. Fruchter RO, Maiman M, Sedlis A, Bartley L, Camilien L, et al. Multiple recurrences of cervical intraepithelial neoplasia in women with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 338-44.
19. Holcomb K, Matthews RP, Chapman JE, Abulafia O, Lee YC, et al. The efficacy of cervical conization in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-positive women. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 428-31.
20. Wright TC, Koulos J, Schnoll F, Swanbeck J, Ellerbrock TV, et al. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus: Outcome after loop electrosurgical excision. *Gynecol Oncol* 1994; 55: 253-8.
21. Fruchter RG, Maiman M, Sillman FH, Camilien L, Webber C, et al. Characteristics of cervical intraepithelial neoplasia in women infected with the human immunodeficiency virus. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 531-7.
22. Petry KU, Kochel H, Bode U, Schedel I, Niester S, et al. Human papillomavirus is associated with the frequent detection of warty and basaloid high-grade neoplasia among immunocompromised women. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 30-4.
23. Holcomb K, Maiman M, Dimaio T, Gates J. Rapid progression to invasive cervix cancer in a woman infected with the human immunodeficiency virus. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 848-50.
24. Maiman M, Fruchter RG, Clark M, Arrastia CD, Matthews R, et al. Cervical cancer as an AIDS-Defining illness. *Obstet Gynecol* 1997; 89: 76-80.
25. Centers for Disease Control. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. *MMWR* 1992; 41(No. RR 17): 1-19.

26. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Morbilidad 1993-1995. Mortalidad 1990-1994. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. 1997.
27. Del Río-Zolezzi A, Liguori A, Magis-Rodríguez C, Valdespino-Gómez JL, García-García ML, et al. La epidemia de VIH/SIDA y la mujer en México. *Salud Publ Mex* 1995; 37: 581-91.
28. Gómez-Estrada H, Vázquez-Escobosa C. Method of separation of lymphocytes from peripheral blood by means of a mixture of Ficoll and Anglo-Conray. *Arch Invest Med* 1982; 13: 85-6.
29. Wright DK, Manos MM. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press Inc, 1990: 153-8.
30. Maiman M, Tarricone N, Vieira J, Suarez J, Serur E, et al., Colposcopic evaluation of human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol* 1991; 78: 84-8.
31. Hankins C, Coutlee F, Lapointe N, Simard P, Tran T, et al. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. *Can Med Assoc J* 1999; 160: 185-91.
32. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang C, Burk R. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-8.
33. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 506-11.
34. Ho GY, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-71.
35. Johnson JC, Burnett AF, Willet GD, Young MA, Doniger J. High frequency of latent and clinical cervical infections in immunocompromised human immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 321-7.
36. Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso P, Salmerón CJ, Hernández AM. Cervical cancer screening in developing countries: Why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 1999; 30: 240-50.
37. Fink MJ, Fruchter RG, Maiman M, Kelly P, Sedlis A, et al. The adequacy of cytology and colposcopy in diagnosing cervical neoplasia in HIV-seropositive women. *Gynecol Oncol* 1994; 55: 133-7.
38. Korn AP, Autry M, DeRemer PA, Tan W. Sensitivity of the Papanicolaou smear in human immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 401-4.
39. Del Priori G, Maag T, Bhattacharya M, Garcia PM, Till M, et al. The value of cervical cytology in HIV-infected women. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 395-8.
40. Robinson WR, Barnes SE, Adams S, Perrin MS. Histology/Cytology discrepancies in HIV-infected obstetric patients with normal Pap smears. *Gynecol Oncol* 1997; 65: 430-3.
41. Goodman A, Chaudhuri PM, Tobin-Enos NJ, Hutchinson ML. The false negative rate of cervical smears in high risk HIV seropositive and seronegative women. *Int Gynecol Cancer* 2000; 10: 27-32.
42. Centers for Disease Control: Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR* 1993; 42(44-14): 83-91.
43. Goldie SJ, Weinstein MC, Kuntz KM, and Freedberg KA. The costs, clinical benefits, and cost-effectiveness of screening for cervical cancer in HIV-infected women. *Ann Intern Med* 1999; 130: 97-107.
44. Lazcano-Ponce EC, Alonso P, López L, Nájera P, Avila R, et al. Validity and reproducibility of cytologic diagnosis in a sample of cervical cancer screening centres in México. *Acta Cytol* 1997; 41: 277-84.

Correlación estadística entre una prueba de transferencia y la transferencia embrionaria en un programa de reproducción asistida: análisis de los resultados

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Julián Ruíz Anguas, Dra. Andrea Baptista Pérez- Avellá,
Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky

Resumen

Objetivo. Determinar si existe correlación estadística entre las variables observadas en la prueba de transferencia que se realiza previa a la estimulación ovárica con aquellas durante la transferencia real de embriones. **Tipo de estudio.** Retrospectivo clínico. **Materiales y método:** Se estudiaron 94 pacientes que ingresaron al programa de FIV-TE a las cuales se les realizó prueba de transferencia previa a la estimulación ovárica. En ésta se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: histerometría, tipo de catéter, grado de dificultad y persona que la realizó. Se practicaron un total de 117 transferencias embrionarias, y durante la transferencia se observaron los mismos parámetros que en la prueba. El análisis estadístico fue la prueba χ^2 . **Resultados.** El tipo de catéter más utilizado en la prueba fue el Cook Soft Pass (92 pacientes), observando una correlación estadísticamente significativa con el utilizado en la transferencia real (94 pacientes). En cuanto a la dificultad, se encontró una prueba de transferencia complicada en 4.2%, difícil en 31.6%, y fácil en 64.2%, lo que estadísticamente tiene correlación con la transferencia real donde fue complicada en 1.7%, difícil en 32.5% y fácil en 65.8%. Así mismo, con la finalidad de descartar factor médico, se intentó que la misma persona que realizó la prueba de transferencia, debería realizar la transferencia real, observando una correlación estadísticamente significativa. La tasa de embarazo por transferencia fue de 27.4%. Al tratar de establecer una asociación entre la dificultad de transferencia real y las tasas de embarazo se observó que no existe una asociación estadística entre una transferencia fácil o difícil. **Conclusiones.** La transferencia embrionaria es un paso fundamental para el éxito en los programas de FIV-TE. Sin embargo, se ve influenciado por una gran variedad de factores que en gran parte son médicos y otros mecánicos. Con estos resultados, se puede concluir que estadísticamente existe correlación entre las variables observadas durante la transferencia embrionaria real y la prueba, por lo que esta última es un elemento de gran utilidad dentro del proceso integral de fertilización *in vitro*, que ayuda a que la transferencia real no se convierta en un procedimiento ciego. ♦

Palabras clave: prueba de transferencia, transferencia embrionaria, reproducción asistida (Kably Ambe A, et al. Correlación estadística entre una prueba de transferencia y la transferencia embrionaria en un programa de reproducción asistida: análisis de los resultados. Ginec Obstet Mex 2003; 71: 44).

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

53 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia
Tercer Lugar de Investigación Clínica

Objective. Determining if a statistical correlation can be established between those variables observed during the transference test performed before ovarian stimulation and those obtained during the real embryo transference. **Type of study.** Clinical retrospective. **Materials and methods.** Ninety four female patients included in the IVF-ET were studied and a transference test previous to ovarian stimulation was performed. The following parameters were considered in this test: hysteroscopy, type of catheter, degree of difficulty, and person performing it. A total of 117 embryonic transferences were carried out, and the same parameters observed during the test were measured. The chi square test was used for the statistical analysis. **Results.** The most commonly used kind of catheter was the Cook Soft Pass (n = 92), and a statistically significant correlation was observed with the one used during the real transference (n = 94). Concerning the degree of difficulty, the transference test resulted complicated in 4.2% of the cases, difficult in 31.6% of them, and easy in 64.2% of them, presenting a statistical correlation with the real transference, where the procedure resulted complicated in 1.7% of the patients, difficult in 32.4% of them, and easy in 65.8%. In addition, and with the intention of ruling out the medical factor, we tried to have the same person performing the transference test and the real procedure, and a statistically significant correlation was also observed. Pregnancy rate per transference was 27.4%. When an association between the difficulty of a real transference and pregnancy rates was tried, no statistical association between an easy or a difficult transference was observed. **Conclusions.** Embryonic transference is a fundamental phase for IVF-ET programs. However, a variety of factors can influence this procedure, some are medical and others are mechanical. Our results allow us to conclude that there is a statistical correlation between those variables observed during the real embryonic transference and the test, so the latter can be considered as a very useful element in the integral *in vitro* fertilization process, which prevents the real transference from becoming a blind procedure.

Key words: transference test, embryonic transference, assisted reproduction.

(Kably Ambe A, et al. Statistical correlation between a transference test and embryonic transference in an assisted reproduction program: result analysis. *Ginec Obstet Mex* 2003; 71: 44).

Introducción

El embarazo clínico logrado a través de fertilización *in vitro* (FIV) se ve influenciado por varios factores críticos: selección de pacientes, protocolo de inducción de ovulación, técnica de aspiración ovocitaria, calidad de óvulos y embriones, receptividad uterina, protocolo de laboratorio y técnica de transfe-rencia. Mientras esta última es el paso final en la FIV, por el momento representa el procedimiento más ineficaz y menos explorado.¹

Así mismo, para lograr el éxito del ciclo de FIV en función de embarazo, es importante conjugar el trabajo del embriólogo para mantener la viabilidad embrionaria junto con el del clínico para evitar una transfe-rencia traumática.

Muchos factores han sido propuestos para tratar de explicar la falla en la implantación: factores embrionarios (calidad, alteraciones cromosómicas, el número de embriones transferido, etc.); factores en la mujer (causa de esterilidad, edad, receptividad endometrial, etc.); y la técnica de transferencia.²⁻⁴

Dentro de esta última se encuentran diversas variables que, sin duda, influyen de manera fundamental sobre el resultado final. Existen controversias en relación con aquellas que se pueden considerar como predictivas para el éxito o la falla de la transferencia.

Mientras que algunas de estas han sido estudiadas ampliamente demostrando su valor real como influencia negativa o positiva, otras han quedado poco estandarizadas y sujetas a la experiencia personal de cada médico o centro, no siendo posible su evaluación objetiva.

Material y método

Idealmente, la transferencia embrionaria exitosa debe consistir en la colocación atraumática de los embriones en el fondo uterino, sitio en el cual la implantación es mayor.⁵

La prueba de transferencia ha demostrado ser un medio útil para tratar de lograr este objetivo, ya que nos permite seleccionar de manera anticipada el tipo de catéter que se va a utilizar, así como determinar la longitud uterina y la dirección en que el catéter debe ser introducido, además de poder detectar oportunamente cualquier grado de estenosis cervical.² Con todas estas medidas se puede anticipar el grado de dificultad que representará la transferencia real así como evitar un número repetido de intentos para la introducción del catéter y el consiguiente riesgo de introducción de microorganismos hacia el ambiente estéril de la cavidad uterina.⁶

Mansour *et al*,^{2,7} evaluó 335 pacientes que aleatoriamente fueron asignadas a un grupo con prueba de transferencia y a otro sin ella. Se encontró dificultad para transferir a los embriones en 50 (29.8%) pacientes en las que no se había realizado prueba previa comparado con ninguna dificultad en el grupo con prueba de transferencia. Para este grupo, las tasas de embarazo e implantación fueron de 22.8% y 7.2%, respectivamente, comparadas con 13.1% y 4.3% en el grupo sin prueba de transferencia. El beneficio que otorga la prueba de transferencia al permitir la medición de la cavidad uterina es lograr evitar tocar el fondo con el catéter durante la transferencia real, ya que esto pudiera condicionar ciertos efectos negativos sobre la implantación como los informados por Yovich⁸ y Nazari⁹ quienes observaron una mayor incidencia de embarazo ectópico al tocar el fondo uterino o al colocar los embriones a menos de 5 mm de éste. Así mismo, la punta del catéter puede desencadenar liberación de prostaglandinas condicionando contracciones uterinas y daño al endometrio.² Waterstone *et al*,¹⁰ informó tasas de embarazo de 24% (33 de 137 pacientes) en quienes durante la transferencia se había avanzado el catéter hasta tocar el fondo, a comparación de una tasa de 46% (45 de 98 pacientes) en aquellas donde el catéter no tocó el fondo.

Por otro lado, la presencia de sangre en la punta del catéter, resultante de una transferencia traumática con lesión al endocervix y/o endometrio, provoca que las células sanguíneas recubran al embrión impidiendo su contacto con el endometrio y a su vez la implantación.⁶

Existen pocos informes en la literatura que evalúen el potencial benéfico de la prueba de transferencia, por lo tanto la finalidad del presente estudio es valorar su utilidad real al correlacionarla con la transferencia real.

Se incluyeron todas las pacientes que ingresaron al programa de fertilización *in vitro* con transferencia de embriones (FIV-TE) entre el 1 de enero y el 31 de diciembre de 2001, en las cuales se había realizado una prueba de transferencia antes de iniciar la estimulación ovárica, independientemente del día del ciclo menstrual. En esta prueba se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: histerometría, el tipo de catéter utilizado, la dificultad de la prueba, así como la persona que la realizó.

La dificultad de la prueba y de la transferencia se basó en el número de intentos para introducir el catéter, asignándose como una transferencia fácil cuando al primer intento se introdujo el catéter, difícil cuando se realizaron dos o más intentos con la colocación de pinza de Pozzi en cervix; y complicada cuando se requirió utilizar histerómetro.

Las pacientes se sometieron a supresión hipofisiaria con acetato de leuprolide (Relisser. Serono México D.F.) iniciado en la fase lútea media del ciclo previo a la estimulación ovárica a dosis de 0.5 mg/día vía subcutánea. Una vez iniciada la estimulación con gonadotropinas la dosis se disminuyó a 0.25 mg/día y se continuó hasta el día de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana. La estimulación ovárica consistió en la aplicación de FSH recombinante (Gonal F, Laboratorio Serono, México D.F.) a partir del tercer día del ciclo, ajustando la dosis de acuerdo al desarrollo folicular evaluado con ultrasonido transvaginal y tomas de estradiol sérico. Una vez observados al menos cuatro folículos > 18 mm, se procedió a la aplicación de 10,000 UI de hCG (Profasi, Laboratorios Serono, México D.F.) vía intramuscular, y aproximadamente 36 horas después se efectuó la captura ovular con guía ultrasonográfica transvaginal.

En el momento de la transferencia embrionaria, que se llevó a cabo en día tres poscaptura, se colocó a la paciente en posición de litotomía con vejiga vacía; se realizó lavado del canal endocervical con HTF, así como aspirado de moco. El catéter de transferencia se cargó con 30-40 microlitros de medio para la transferencia, y un promedio de tres embriones. Una vez introducido el catéter, se esperó un tiempo de 30 segundos para inyectar a los preembriones, posteriormente se mantuvo a la paciente en reposo en decúbito dorsal durante tres horas, y finalmente fue egresada de la unidad de reproducción asistida.

Durante la transferencia se corroboraron los mismos parámetros (histerometría, dificultad de la transferencia, catéter utilizado, y persona que la realizó).

Así mismo se valoró la presencia de sangre, moco o dolor durante el momento de la transferencia que son variables que pudieran influir negativamente sobre las tasas de embarazo.

El análisis estadístico para comparar las variables estudiadas fue a través de la prueba de χ^2 .

Resultados

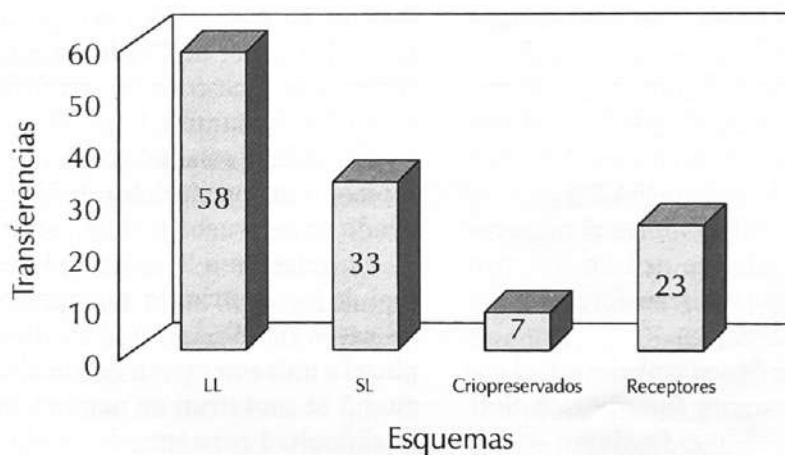
Se incluyeron 94 pacientes con edades entre 23 y 46 años de edad con una media de 34.5 ± 4.85 años, en las cuales se realizaron 117 transferencias de embriones. Los esquemas de supresión hipofisiaria utilizados fueron Protocolo Lúteo Largo (LL) 45 pacientes (58

transferencias), Stop Lucrin (SL) 27 pacientes (33 transferencias), en 22 pacientes se realizó preparación endometrial con estradiol 8 mg/día (Primogyn), de las cuales cinco pacientes (siete transferencias) fueron con embriones congelados y 17 pacientes (23 transferencias) fueron receptoras del programa de donación altruista de ovocitos (Figura 1).

La transferencia de embriones se realizó en día tres poscaptura en aquellas pacientes que se realizó estimulación ovárica.

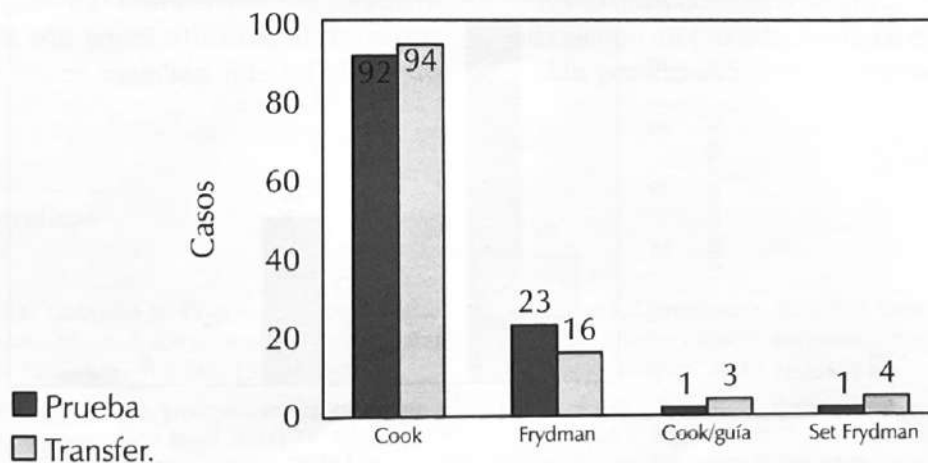
La prueba de transferencia se realizó en el día 13.6 ± 7.4 del ciclo. El catéter que se utilizó con mayor frecuencia en ésta fue el catéter de Cook Soft Pass (Cook, Spencer, IN, EUA) en 92 transferencias, seguido del Frydman en 23 transferencias. Cook con

FIGURA 1



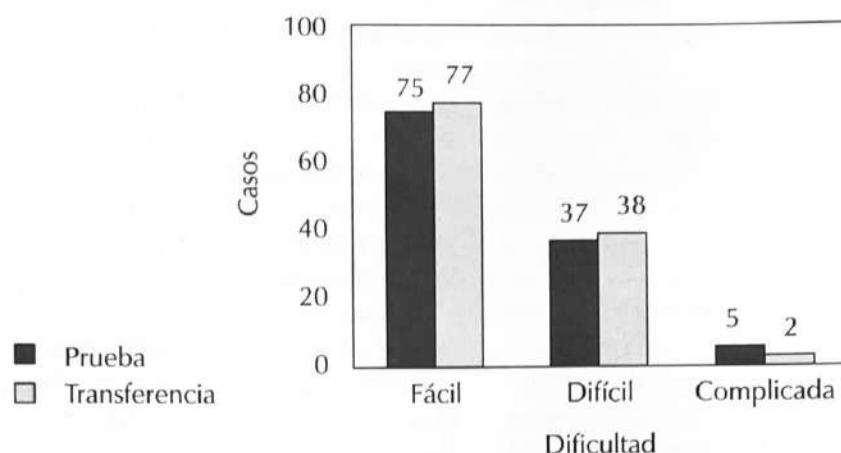
Esquemas de estimulación.

FIGURA 2



Tipos de catéter utilizado.

FIGURA 3



Dificultad de transferencia.

guía en una transferencia y el set de Frydman en una transferencia.

Al valorar la dificultad durante la prueba, se observó que en cinco casos ésta fue complicada (4.2%), requiriendo utilizar histerómetro, en 37 casos difícil (31.6%), y en 75 casos se consideró fácil (64.2%).

El intervalo de tiempo que existió entre el momento de la prueba y la transferencia fue de uno a cuatro meses en la mayoría de los casos (82 transferencias), y en las 35 restantes hasta de 12 meses.

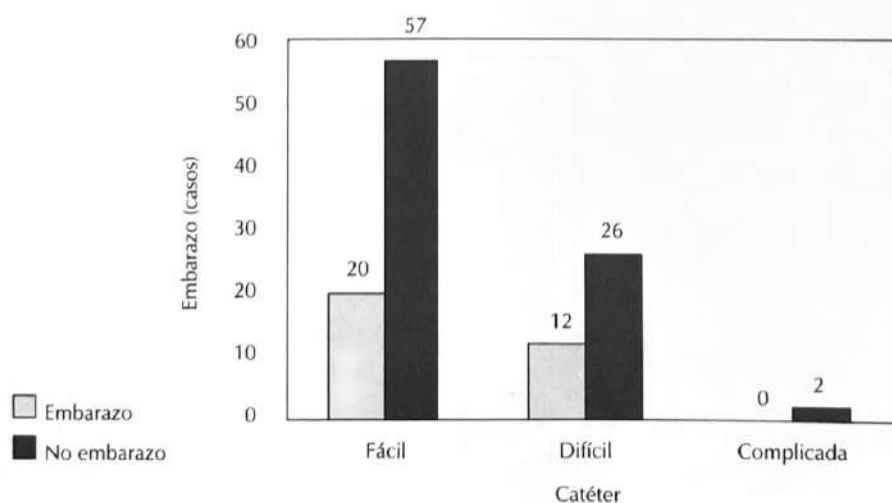
Al realizar la transferencia de los embriones, el catéter utilizado más frecuentemente fue el Cook Soft Pass en 94 transferencias (80.3%), el Frydman se uti-

lizó en 16 casos (13.7%), el Cook con guía en tres (2.6%) y el set de Frydman en cuatro (3.4%). En la figura 2 se muestra comparativamente el tipo de catéter utilizado durante la prueba y la transferencia real.

El análisis estadístico de χ^2 a 95% de significancia mostró una correlación estadística entre el catéter utilizado en la prueba y el de la transferencia.

En relación a la dificultad durante la transferencia real de los embriones se observó que ésta fue fácil en 77 casos (65.8%), difícil en 38 casos (32.5%) y complicada únicamente en dos pacientes (1.7%). En la Figura 3 se muestran de manera comparativa los niveles de dificultad para introducir el catéter en la prueba de

FIGURA 4



Correlación embarazo con dificultad de prueba.

transferencia y la transferencia real con una correlación importante a través de prueba χ^2 con 95 % de significancia entre ellas.

El número de embriones transferidos fue de 3.8 ± 1.5 por caso, y la tasa de embarazo por transferencia fue de 27.4 %.

Así mismo, con la finalidad de descartar un factor médico que pudiera influir sobre la transferencia en sí, se intentó que la misma persona que realizó la prueba de transferencia, debería realizar la transferencia real, observando una correlación estadísticamente significativa con prueba de χ^2 a 95 % de significancia.

Al tratar de establecer una asociación entre la dificultad de transferencia real y las tasas de embarazo se observó que no existe una asociación estadística entre una transferencia fácil o difícil (Figura 4).

En relación con la presencia de sangre en el catéter al final de la transferencia se observó en nueve casos (7.6 %) y ninguna de las pacientes logró embarazo.

Conclusiones

La transferencia embrionaria es un paso fundamental para el éxito en los programas de FIV-TE. Sin embargo, se ve influenciado por una gran variedad de factores que en gran parte son médicos y otros mecánicos.

La mayoría de los resultados en la literatura hacen referencia a la transferencia traumática como un procedimiento que afecta de manera negativa sobre las tasas de embarazo, por lo que se ha mencionado que la prueba de transferencia puede ayudar, por ejemplo, a predecir dificultad para introducir el catéter, o la manera y dirección en que se debe dirigir éste.

En el presente estudio se comparó la relación que existe entre la prueba de transferencia y la transferencia real. En primer lugar, se observó que el catéter utilizado en la prueba presentó una correlación estadísticamente significativa con aquel utilizado al transferir los embriones; cabe hacer mención que en el centro

donde se realizó el estudio, tiene preferencia por el uso del catéter Cook Soft Pass, por lo cual fue el más utilizado (80.3 %). Lo anterior porque se coincide con lo informado en la literatura en donde se hace mención que los catéteres suaves provocan menos daño al endometrio.² Sin embargo, en muchas ocasiones la elección parece depender de preferencias personales, sin que esto tenga implicación sobre tasas de embarazo.¹¹

Al comparar el grado de dificultad entre la prueba y la real, también se observó una correlación significativa, por lo que si la prueba es difícil la transferencia real también lo será, sin embargo, la realidad es que una transferencia difícil se presenta con poca frecuencia, autores como Noyes y colaboradores¹² informan incidencias de 0.6 %. En el presente estudio se observó sólo en 1.7 % de los casos. El detectar la dificultad con una prueba ofrece la ventaja de tratar con anticipación alguna patología cervical mediante resección histeroscópica y la posterior dilatación con sonda de Foley o Malecot del canal endocervical, facilitando así la transferencia de embriones.^{12,13}

Al correlacionar la dificultad de la transferencia con las tasas de embarazo no se observó una asociación estadísticamente significativa, esto puede indicar que la transferencia traumática no es un factor decisivo para mejorar las tasas de embarazo. Estos hallazgos también fueron informados por Burke y colaboradores,⁴ que mencionan que el grado de dificultad en la transferencia no disminuye las posibilidades de obtener buenos resultados, el número y calidad embrionaria son probablemente las variables más importantes para predecir el éxito cuando se excluye la variabilidad entre los médicos que practican la transferencia. En nuestro estudio, se intentó evitar esta variabilidad ya que únicamente dos personas realizaron tanto la prueba como la transferencia, y la misma persona que realizó la prueba realizó la transferencia.

Por lo que podemos concluir que la transferencia continúa siendo un procedimiento no estandarizado, no controlable, poco modificable y hasta cierto punto ciego.

Referencias bibliográficas

1. Wood E, Baizer F, Go K, Gutmann N, Corson S. Ultrasound-guided soft catheter embryo transfers will improve pregnancy rates in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15: 107-12.
2. Schoolcraft W, Surrey E, Gardner D. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001; 76: 863-70.
3. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 64: 382-91.
4. Burke L, Davenport A, Russell G, Deaton J. Predictors of success after embryo transfer: Experience from a single provider. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 1001-4.
5. Martinez F, Coroleu B, Parriego M, Carreras O, Belil I, Parrera N, Hereter L, Buxaderas R, Barri P. Ultrasound-guided embryo transfer: immediate withdrawal of the catheter versus a 30 second wait. *Hum Reprod* 2001; 16: 871-4.

6. Salha O, Lamb V, Balen A. A postal survey of embryo transfer practice in the UK. *Hum Reprod* 2001; 16: 686-90.
7. Mansour R, Aboulghar M, Serour G. Dummy embryo transfer: a technique that minimizes the problems of embryo transfer and improves the pregnancy rate in human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 54: 678-81.
8. Yovich J, Turner S, Murphy A. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancies in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985; 44: 318-21.
9. Nazari A, Azkari H, Check J, O'Shaughnessy A. Embryo transfer technique as a cause of ectopic pregnancies in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993; 60: 919-21.
10. Waterstone J, Curson R, Parsons J. Embryo transfer to low uterine cavity. *Lancet* 1991; 337: 1413.
11. Urman B, Aksoy S, Alatas C, Mercan R, Nuhoglu A, Isiklar A, et al. Comparing two embryo transfer catheters use of a trial transfer to determine the catheter applied. *J Reprod Med* 2000; 45: 135-8.
12. Noyes N, Licciardi F, Grifo J, Krey L, Berkeley A. In vitro fertilization outcome relative to embryo transfer difficulty: a novel approach to the forbidding cervix. *Fertil Steril* 1999; 72: 261-5.
13. Yanushpolsky EH, Ginsburg ES, Fox JH, Stewart EA. Transcervical placement of a Malecot catheter after hysteroscopic evaluation provides for easier entry into the endometrial cavity for women with histories of difficult intrauterine inseminations and/or embryo transfers: a prospective case series. *Fertil Steril* 2000; 73: 402-5.