GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA
DE MÉXICO

Contenido

Vol. 70, Abril 2002

169 **EDITORIAL**

ARTÍCULOS ORIGINALES

171 **Alteración de la respuesta inmunológica sistémica en asociación con endometriosis, empleando un modelo de estudio animal**

Dr. Cesar Ángel Hernández Guerrero, Dr Felipe Vadillo Ortega, Dr Rubén Tlapanco Barba, Dra. Lourdes Arriaga Pizano, Dr. Arturo Cérbulo Vázquez, M.C. Marco Antonio González Jiménez, Dr. Jorge Beltrán Montoya

El objetivo del estudio fue evaluar la relación entre el desarrollo de tejido endometrial ectópico y el estado inmunológico, enumerando las subpoblaciones de linfocitos y síntesis de citocinas en linfocitos T, utilizando un modelo de endometriosis murino, con dos grupos de estudio de 10 ratones hembra de la cepa Balb/c. La presencia de tejido endometrial en la cavidad uterina disminuye la cantidad de linfocitos T citotóxicos e incrementa la producción de IL-4 por linfocitos T totales, lo cual sugiere una modulación de la respuesta inmunológica sistémica hacia TH-2.

182 **Alteración en los potenciales de membrana mitocondrial y su relación exponencial con la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática como marcadores en los eventos iniciales de apoptosis: evaluación en diferentes fracciones espermáticas**

Dr. Gerardo Barroso Villa, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky, Dr. Ernesto Castelazo Morales, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Alberto Kably Ambe

El objetivo fue determinar la integridad de la membrana plasmática a través de la translocación de fosfatidilserina en dos fracciones espermáticas y su correlación con los potenciales de membrana niitocondrial espermática. Por diseño de estudio, se manifestaron diferencias en cuanto a los parámetros de desplazamiento y la presencia de apoptosis tanto en la membrana plasmática como en los potenciales de membrana mitocondrial. Hubo correlación positiva entre la función mitocondrial y la función de membrana citoplasmática. Es probable que la población de infertilidad masculina esté asociada con un incremento en este tipo de procesos de apoptosis.

190 **Caracterización bioquímica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1-β como mediador de degradación de tejido conectivo en membranas corioamnióticas humanas en cultivo**

Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez, Felipe Vadillo-Ortega, Marco A. Jiménez González, Jorge Beltrán Montoya, Silvia Giono Cerezo

El objetivo del estudio experimental con modelo *in vitro* fue caracterizar el efecto de la IL-1-β sobre el metabolismo de tejido conectivo de la membrana corioamniótica humana en cultivo (MCA). Las MCA permanecieron con adecuada viabilidad y funcionalidad. La información presentada permite concluir que la IL-1-β es capaz de inducir la expresión de enzimas con efecto sobre el tejido conectivo y con ello se confirma su participación en el proceso de ruptura de las membranas bajo condiciones de inflamación.

196 **Competitividad óvulo-embionaria determinada a través de la cuantificación de los índices perifoliculares en la microarquitectura vascular por Doppler**

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. José Antonio Pérez Mendizábal, Dra. Alejandra Sánchez De León, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky, Dr. Gerardo Barroso Villa

Se trata de un estudio prospectivo y observacional cuyo objetivo fue correlacionar en forma lineal los índices de flujometría Doppler con el desarrollo folicular y su consiguiente desarrollo embrionario en ciclos de hiperestimulación ovárica en los resultados de FIVTE/ICSI. Se encontró una correlación entre los índices de resistencia y la obtención de folículos maduros ($P = 0.05$), al mismo tiempo se encontró una relación negativa de FSH con volumen ovárico. Por los resultados obtenidos, podemos expresar que los índices de flujometría por Doppler, pueden ser indicadores de la expresión folicular y su consecuente desarrollo ovular y embrionario.

203 **Infección cervicovaginal como factor de riesgo para parto pretérmino**

Jorge Beltrán Montoya, Marco Antonio Avila-Vergara, Felipe Vadillo-Ortega, César Hernández-Guerrero, Felipe Peraza-Garay, Sergio Olivares-Morales

Se realizó un estudio de cohortes para identificar si existe asociación entre infección cervicovaginal (ICV) y parto pretérmino. Se concluye que existe diferencia en la duración del embarazo entre las pacientes con ICV y sin ICV. *Ureaplasma urealyticum* se asocia consistentemente con parto pretérmino.

210 **La cirugía pélvica como un marcador predictivo de la respuesta folicular a los inductores de ovulación**

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Oscar Aguirre Barrera, Dr. Guillermo Carpio Pertierra, Dr. Carlos Quesnel García-Benítez, Dr. Gerardo Barroso Villa

El objetivo del esudio fue comparar la respuesta folicular en un grupo de pacientes con antecedente de cirugía pélvica sometidas a fertilización *in vitro*. Es probable que los procedimientos quirúrgicos junto con procesos adherenciales tengan una relación directa con las características del ambiente perifolicular que interfieren en el desarrollo ovular en forma adecuada. El presente estudio demuestra que en el grupo de estudio existe una respuesta folicular disminuida con un detrimento en la calidad óvulo-embrionaria expresada en la tasa de embarazo.

215 **INSTRUCCIONES PARA AUTORES**

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

Contents

Vol. 70, April 2002

169 EDITORIAL

ORIGINAL ARTICLES

171 **Alteration of the systemic immunological response associated to endometriosis using an animal study model**

Dr. Cesar Ángel Hernández Guerrero, Dr Felipe Vadillo Ortega, Dr Rubén Tlapanco Barba, Dra. Lourdes Arriaga Pizano, Dr. Arturo Cérbulo Vázquez, M.C. Marco Antonio González Jiménez, Dr. Jorge Beltrán Montoya

The objective was to evaluate the relationship between the development of ectopic endometrial tissue and the immunological status, and enumerating lymphocyte subpopulations and cytokine synthesis in T lymphocytes, using a murine endometriosis model. Spleen lymphocytes isolated from two study groups of 10 female mice of the Balb/c strain. The presence of endometrial tissue in the uterine cavity decreases the amount of cytotoxic T lymphocytes and increases IL-4 production in total T lymphocytes, suggesting a modulation of the systemic immunological response to TH-2.

182 **The alteration of mitochondrial membrane potential and its exponential relationship to phosphatydylserine translocation in the plasmatic membrane as markers in the initial events of apoptosis: its evaluation in different spermatic fractions**

Dr. Gerardo Barroso Villa, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky, Dr. Ernesto Castelazo Morales, Dra. Esperanza Carballo Mondragón, Dr. Alberto Kably Ambe

The objective was to determine the integrity of the plasmatic membrane through phosphatydylserine translocation in two spermatic fractions and their correlation with the spermatic mitochondrial membrane potential. Due to the study's design, some differences were observed regarding the displacement parameters and the presence of apoptosis, both, in the plasmatic membrane and in mitochondrial membrane potentials. A positive correlation between both, mitochondrial and cytoplasmic membrane functions was also found. The male infertility population is probably associated with an increase in this kind of apoptosis processes.

190 **Biochemical and ultrastructural characterization of the 1-β, interleukine effect as a mediator of connective tissue degradation in human chorio-amnionic membrane tissue culture**

Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez, Felipe Vadillo-Ortega, Marco A. Jiménez González, Jorge Beltrán Montoya, Silvia Giono Cerezo

The objective of this experimental, in an *in vitro* model study was to characterize the effect of 1-β,-IL on connective tissue metabolism in a human chorio-amnionic membrane tissue culture (CAM). CAM explants obtained from cesarean sections were cultured. The information presented here allows us to conlude that 1-β-IL is capable of inducing an enzymatic expression affecting connective tissue, thus confirming its participation in membrane degradation processes under inflammatory conditions.

196 **Ovum-embryo competitivity determined by the Doppler quantification of perifollicular rates in vascular microarchitecture**

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. José Antonio Pérez Mendizábal, Dra. Alejandra Sánchez De León, Dr. Samuel Karchmer Krivitzky, Dr. Gerardo Barroso Villa

To obtain the linear correlation between Doppler fluxometry rates and follicular development and the observed embryonary growth in ovarian hyperstimulation cycles in the IVFTE/ICSI results, a prospective and observational study was performed. A correlation between RR and the formation of mature follicles was observed (P = 0.05), and, at the same time, a negative relationship between FSH and ovarian volume was found. Considering the data obtained in our study, we can say that Doppler fluxometry rates can indicate follicular expression and the resulting ovum and embryo development.

203 **Cervicovaginal infections as a risk factor for preterm delivery**

Jorge Beltrán Montoya, Marco Antonio Avila-Vergara, Felipe Vadillo-Ortega, César Hernández-Guerrero, Felipe Peraza-Garay, Sergio Olivares-Morales

A cohorts study was performed to identify the possible association between cervicovaginal infections (CVI) and preterm delivery There is a difference in the duration in pregnancy in patients with CVI and without CVI. Ureaplasma urealyticum is consistently associated with preterm delivery.

210 **Pelvic surgery as a predictive marker of follicular response to ovulation inducers**

Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Oscar Aguirre Barrera, Dr. Guillermo Carpio Pertierra, Dr. Carlos Quesnel García-Benitez Dr. Gerardo Barroso Villa

The objective of this study was to compare the follicular response in a group of patients with previous pelvic surgery submitted to *in vitro* fertilization. Surgical procedures, combined with adherence processes, probably have a direct incidence on the characteristics of the perifollicular environment which interfere with adequate development of the ovum. Our research shows that the group under study presents a decrease in follicular response affecting the quality of the ovum-embryo expressed in the pregnancy rate.

215 INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA
DE MÉXICO

Editorial

■ DISCURSO INAUGURAL DEL 52 CONGRESO MEXICANO DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

Lunes 8 de octubre 2001, Tijuana, B.C.

Señor Gobernador Constitucional del Estado de Baja California, Lic. Alejandro González, Presidente del LII Congreso Mexicano de Ginecología Y Obstetricia.

Distinguidos Miembros de la Mesa de Honor, Compañeros Médicos Congresistas, Señoras y Señores:

Es para mí un gran honor y un privilegio poder dirigirles un mensaje de la FEMEGO con motivo del 52 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia que hoy se inicia y que ha sido organizado por la Asociación de Ginecología y Obstetricia de Tijuana y la Región II de la Federación, misma que abarca los estados de Baja California, B.C. Sur y Sonora con siete agrupaciones de Ginecología y Obstetricia y auspiciada por la propia FEMEGO que coordina y apoya a los Comités Organizadores de los Congresos Mexicanos con la finalidad de dar un equilibrio científico y de gran objetividad a las diferentes regiones del país. Actualmente son 72 las agrupaciones que las constituyen, distribuidas en los estados de nuestra república, todas ellas están representadas en este 52 Congreso.

El Congreso Mexicano es el máximo exponente de las actividades académicas de la Federación y en sí marca la culminación de este tipo de actividades, precedido por las Reuniones Regionales, cursos, talleres y sesiones en ocasiones conjuntas con agrupaciones afines, siempre buscando la excelencia en la educación médica continua tal y como lo señala el estatuto vigente de la FEMEGO.

Tijuana ha sido clave en la organización de nuestros congresos de los cuales fue sede en dos ocasiones previas, la primera, en octubre de 1969 —en aquel entonces XVI Reunión Nacional— cuyo presidente fue el doctor Rafael Bravo Alvarez, la segunda, en 1993 —III Congreso Nacional— presidido por el doctor Ignacio Saldaña, que dejaron honda huella entre la familia ginecoobstétrica mexicana tanto por el valor de su programa académico como por las actividades sociales y culturales que como siempre aumentaron los lazos de amistad entre todos nosotros.

Es probable que el intento por lograr el camino hacia la dorada madurez sea la causa que obliga al hombre a marcar altos en el camino, a veces para mirar hacia atrás, otras para imaginar el porvenir, siempre con la conciencia de que la única manera de entender el presente y predecir el futuro resulta del análisis objetivo y honesto del acontecer histórico. En este año los libros, las revistas y los congresos rara vez omiten mencionar el nuevo milenio y anunciar un periodo fabuloso, esta transición es motivo para hacer una reflexión y una pausa por parte de los ginecoobstetras, así por ejemplo: qué avances en la medicina reproductiva se realizaron en el ultimo siglo, hemos mejorado la suerte de nuestras enfermas, ¿cuando será el siguiente avance notable en nuestro campo y en qué área? Por todo ello, un congreso de esta naturaleza es más que una crónica del estado actual de la medicina y la ciencia, cada presentación empareja una perspectiva histórica con una mirada hacia el futuro.

El cuidado de la salud en nuestra área de ginecoobstetricia constituye un campo muy dinámico. Por una parte, la explosión de la información y las incesantes innovaciones tecnológicas presionan para introducir cambios en nuevas intervenciones o en el perfeccionamiento de las que ya disponemos para aumentar su eficacia o bien para disminuir su costo y reacciones adversas. Por otra parte, continuamente nos enfrentamos a nuevos retos en esta que podríamos llamar vorágine del progreso, un ejemplo lo constituye sin duda la cirugía endoscópica iniciada formalmente en Kiel por el profesor Semm, que dio pasos progresivos hasta el

momento actual en que 80% de las operaciones clásicas en ginecología pueden realizarse por técnicas endoscópicas y que propició el siguiente paso cibernético que lo constituye la robótica por ejemplo, el *Robotic Laparoscope Positioner*, que responde a la voz; el programa Hermes que permite al cirujano controlar con la voz insufladores, equipo y coaguladores, electrodos, fuentes de luz, etc. que se integran a equipos de imágenes, laboratorios y otros servicios auxiliares y necesarios, sólo para citar algunos de ellos. Otro lo es la llamada medicina basada en evidencias que incluye la formalización del método científico a la práctica de la medicina para identificar las fuerzas que apoyan las decisiones clínicas, el médico debe conocer la valoración crítica y los principios epidemiológicos básicos del diseño de estudio, el riesgo relativo, la relación de probabilidades, los intervalos de confianza, el sesgo y los elementos de confusión. Con esta información puede clasificar las pruebas, valorar la causalidad y hacer recomendaciones basadas en aquellas. Hay muchas definiciones pero la más acertada es la de David Sackett de la Unversidad de Ontario, quien la define como la utilización consciente explícita y juiciosa de la mejor prueba actual en la toma de decisiones sobre la atención de los pacientes.

El uso de nuevas tecnologías representa uno de los temas más excitantes de la ginecología actual, no obstante, los posibles beneficios tienen un costo cuando se introducen por primera vez tecnologías nuevas ya que éste puede disminuir por falta de destreza técnica, comprensión insuficiente del riesgo, criterios no bien definidos de selección de pacientes y resultados inciertos a largo plazo. Esta atención entre el beneficio esperado y la posibilidad de lesiones reta a los ginecólogos que consideran el uso de nuevas tecnologías quienes deben equilibrar su entusiasmo y buenas intenciones en el análisis honesto y real del costo-beneficio y no perder de vista que la esencia de nuestra profesión está en el humanismo que algunas de estas tecnologías necesariamente ignoran.

La ginecología y obstetricia es una especialidad integral cuya incorporación de mayores conocimientos del proceso reproductivo, gestacional, fetal y perinatal así como la de Urología y Oncología Ginecológica, en el especial cuidado de la mujer en la etapa del climaterio han creado dentro de la especialidad básica, subespecialidades que requieren de toda la atención y el conocimiento del médico para llevar a cabo su mejor tratamiento, teniendo la mujer todo el derecho de recibir este tipo de medicina integral de excelencia.

Todas estas consideraciones son simplemente para resaltar el gran esfuerzo realizado por el Comité Organizador de este 52 Congreso Mexicano, encabezado por su presidente, el doctor Alejandro González, quienes han demostrado de una manera desinteresada el profesionalismo, cariño y afecto a la FEMEGO a través de su asociación ya que de otra manera no hubiera sido posible concretar este programa científico que está dando inicio oficialmente el día de hoy y que seguramente será de todo nuestro beneficio y agrado.

Una mención especial me merecen los profesores participantes en este Congreso, ya que todos han recibido una invitación formal y de esta misma manera han decidido participar, compartiendo con nosotros su conocimiento y experiencia, a los profesores extranjeros, les agradecemos su asistencia y oportunidad de ofrecerles nuestra hospitalidad.

El Comité de Damas, encabezado por la Dra. Nora de González ha elaborado un extraordinario programa de actividades culturales y sociales que harán más agradable nuestra estancia en esta ciudad de Tijuana y que seguramente servirán para afirmar los lazos de amistad de la familia ginecoobstétrica mexicana.

Reciban mi más sincera felicitación por esta labor.

Compañeros congresistas, les doy las gracias por asistir y participar a nuestro magno evento anual y los invito a que disfrutemos de este 52 Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia y que seguramente marcará una etapa en todos los ámbitos.

Por la salud y el bienestar de la mujer mexicana muchas gracias

Dr. Jorge Delgado Urdapilleta

Ginecología y Obstetricia de México

Alteración de la respuesta inmunológica sistémica en asociación con endometriosis, empleando un modelo de estudio animal

■ Dr. Cesar Ángel Hernández Guerrero,[1] Dr Felipe Vadillo Ortega,[2] Dr Rubén Tlapanco Barba,[3] Dra. Lourdes Arriaga Pizano,[4] Dr. Arturo Cérbulo Vázquez,[5] M.C. Marco Antonio González Jiménez,[6] Dr. Jorge Beltrán Montoya

■ **RESUMEN**

Introducción. La endometriosis representa el crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Su etiopatogenia es desconocida aunque existen evidencias que la asocian con disminución de la actividad citotóxica del sistema inmunológico. ***Objetivo.*** Utilizando un modelo de endometriosis murino, evaluar la relación entre el desarrollo de tejido endometrial ectópico y el estado inmunológico, enumerando las subpoblaciones de linfocitos y síntesis de citocinas en linfocitos T. ***Metodología***. Con dos grupos de estudio de 10 ratones hembra de la cepa Balb/c, sometidos a implantación quirúrgica de tejido endometrial autólogo en la cavidad peritoneal, sacrificados a las 5 (grupo I) y 8 semanas (grupo II), se aislaron linfocitos del bazo, incubándose o no con PMA/Ionomicina. Con citometría de flujo se determinaron los linfocitos T y su producción de citocinas. ***Resultados.*** Se observó menor dispersión del valor de crecimiento del tejido ectópico en el grupo II (24% contra 42%). Observamos una menor población de linfocitos T citotóxicos y mayor producción de IL-4 en las células estimuladas del grupo de estudio ($p < 0.05$) respecto al grupo testigo. ***Conclusiones.*** La presencia de tejido endometrial en la cavidad uterina disminuye la cantidad de linfocitos T citotóxicos e incrementa la producción de IL-4 por linfocitos T totales, lo cual sugiere una modulación de la respuesta inmunológica sistémica hacia TH-2.

Palabras clave: Respuesta inmunológica, endometriosis, modelo animal, linfocitos.

(Hernández Guerrero CA. *et al.* Alteración de la respuesta inmunológica sistémica en asociación a endometriosis, empleando un modelo de estudio animal. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 171).

■ **ABSTRACT**

Introduction. *Endometriosis constitutes the growth of endometrial tissue in a place other than the uterine cavity. Its etiopathogenesis is unknown, although there is some evidence associating it with the decrease of cytotoxic activity in the immunological system.* ***Objective.*** *Evaluating the relationship between the development of ectopic endometrial tissue and the immunological status, and enumerating lymphocyte subpopulations and cytokine synthesis in T lymphocytes, using a murine endometriosis model.* ***Methodology.*** *Spleen lymphocytes isolated from two study groups of 10 female mice of the Balb/c strain that had been submitted to the surgical implantation of autologous endometrial tissue in the peritoneal cavity, and sacrificed after 5 (group I) and 8 (group II) weeks, were incubated —or not— with PMA/Ionomicine. Lymphocyte T numbers and their cytokine*

Instituto Nacional de Perinatología

[1]Jefe del Departamento de Ultramicroscopia; [2]Director de Investigación; [3]Jefe del Departamento de Fisiología de la Reproducción; [4]Estudiante de Doctorado, Departamento de Ultramicroscopia; [5]Investigador Asociado "A", Departamento de Infectología e Inmunología Perinatal; [6]Investigador Asociado "B", Departamento de Ultramicroscopia

production were determined by flow citometry. ***Results.*** *A lower dispersion of the ectopic tissue growth value was observed in group II (24% vs. 42%). A smaller population of cytotoxic T lymphocytes and a greater IL-4 production in the stimulated cells of the study group ($p < 0.05$) were observed, as compared to the control group.* ***Conclusions.*** *The presence of endometrial tissue in the uterine cavity decreases the amount of cytotoxic T lymphocytes and increases IL-4 production in total T lymphocytes, suggesting a modulation of the systemic immunological response to TH-2.*

Key words: Immunological response, endometriosis, animal study model, lymphocytes.

(Hernández Guerrero CA. *et al.* Alteration of the systemic immunological response associated to endometriosis using an animal study model. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 171).

■ INTRODUCCIÓN

La endometriosis, fenómeno representado por la presencia y crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, es un problema de salud reproductiva de gran importancia pues se reporta en un valor alrededor de 5% de incidencia en población abierta y entre 30 a 50% en asociación con esterilidad.[1] En esta patología el tejido endometrial ectópico se encuentra constituido por los mismos elementos que presenta el tejido eutópico, es decir glándulas, arterias espirales, células endometriales y estroma.

A la fecha se desconoce la etiopatogenia del evento y se acepta la hipótesis del trasplante propuesta por John Sampson,[2] como la más veraz para explicar la manera en la que el tejido endometrial alcanza la cavidad peritoneal. Esta hipótesis describe que células y tejido endometrial proveniente del fluido menstrual durante la descamación uterina, llegan al peritoneo a través de las tubas por contraflujo y bajo condiciones "específicas" del microambiente peritoneal y son capaces de implantarse y proliferar en forma ectópica. Diversos reportes[3,4] han mostrado que alrededor de 90% de las mujeres estudiadas, presentan en la cavidad peritoneal componentes provenientes de la descamación uterina durante la fase menstrual del ciclo ovulatorio. Asimismo, ha sido posible identificar que células endometriales obtenidas del ambiente peritoneal en esta fase, expresan viabilidad mayor a 50% y son capaces de implantarse, proliferar y responder a hormonas esteroideas al cultivarlas *in vitro* o implantándolas en diversos tejidos de modelos animales.[5-7]

Dando por hecho que durante la etapa exfoliativa del endometrio un porcentaje muy alto de mujeres presenta menstruación retrógrada hacia el peritoneo, que células y tejido endometrial recuperado de esta cavidad expresan la capacidad de implantarse y proliferar, y que al parecer es un evento normal durante la vida reproductiva de la mujer; diversos grupos de investigación en el mundo[8-13] han planteado y reportado evidencias que señalan alteraciones inmunológicas del tipo celular y soluble en el microambiente peritoneal de mujeres con endometriosis, las cuales parecen tener asociación con una deficiente capacidad para eliminar las células y tejido endometrial que arriba periódicamente al peritoneo. En condiciones normales, la actividad de estas células debería ser tal que permitiera la eliminación de las células y desechos del tejido. Hill[14] analizó subpoblaciones de linfocitos en el líquido peritoneal de mujeres infértiles con y sin endometriosis mediante inmunohistoquímica, encontró elevación de los linfocitos T totales (CD 3+), T cooperadores (CD 4+), NK (CD 16+) y monocitos/macrófagos (CD 14+) en los estadios I y II de endometriosis. Iwasaki[15] analizó mediante citometría de flujo, subpoblaciones de linfocitos en el líquido peritoneal de mujeres con y sin endometriosis, solamente encontró disminución significativa en la cantidad de linfocitos T citotóxicos (CD 8+), tanto en líquido peritoneal como en sangre periférica en mujeres con endometriosis, al compararlas con el grupo control. Oosterlynck,[16] al estudiar subpoblaciones de linfocitos en líquido peritoneal y sangre periférica de mujeres infértiles con y sin endometriosis y mujeres sanas fértiles, observó un aumento en la cantidad de monocitos/macrófagos (CD 14+), disminución de linfocitos T cooperadores (CD 4+), y aumento de linfocitos T citotóxicos (CD 8+), con la consiguiente inversión de la relación CD4+/CD8+, en el líquido peritoneal de mujeres con endometriosis. En sangre periférica, no identificó diferencias en las subpoblaciones analizadas entre los grupos de estudio, pero comparando el ambiente peritoneal de los tres grupos, con el compartimiento periférico, observó disminución significativa en cuanto a linfocitos T cooperadores y T citotóxicos, con un valor

de $p < 0.005$. En el mismo año Opsahl,[17] mediante citometria de flujo, analizó subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica y líquido peritoneal, de mujeres sanas normales e infértiles con y sin endometriosis, encontrando disminución de los linfocitos T activados en el líquido peritoneal de las mujeres con endometriosis, al compararlos con los valores de las mujeres infértiles sin endometriosis y mujeres sanas normales ($p < 0.05$).

Por otro lado, encontró diferencia significativa en las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y monocitos, al comparar el ambiente peritoneal con el ámbito periférico.

Los diversos datos reportados a la fecha señalan en general que el ambiente peritoneal y/o periférico de las mujeres que presentan la patología, manifiesta una disminución en el número de linfocitos T cooperadores que se encargan de coordinar y dirigir la respuesta inmunológica. Asimismo, dicha población celular, así como los linfocitos T citotóxicos (CD8+) expresan una menor actividad citolítica al analizarlas en sistemas *in vitro*. Al respecto, Melioli[18] logró identificar un abatimiento en la actividad citotóxica no sólo de linfocitos T cooperadores (CD3+/CD4+), observó que la subpoblación de linfocitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) que es una de las estirpes celulares más activa encargada de eliminar células infectadas, dañadas o alteradas, se encontraba abatida al enfrentarla a células endometriales autólogas en cultivo provenientes de mujeres con endometriosis, en comparación con los valores mostrados por las mismas estirpes celulares pero obtenidas de mujeres sanas fértiles. Asimismo, en asociación con la patología, se ha informado una menor actividad citotóxica por parte de células asesinas naturales (NK). Los reportes en la literatura han identificado disminución de la actividad efectora, más que disminución del número celular al analizar muestras obtenidas del compartimento periférico y peritoneal de mujeres con endometriosis, en comparación con la actividad identificada en células NK de mujeres sanas, al evaluar la función citocida sobre líneas celulares en cultivo, o empleando células endometriales autólogas y heterólogas como células diana.[19-24]

Al parecer, el ambiente peritoneal y/o periférico de las mujeres que presentan endometriosis, muestra abatimiento del número en algunos casos y actividad en otros, de las subpoblaciones de linfocitos más importantes involucradas en la remoción y destrucción de células muertas, dañadas o infectadas. Actualmente se desconoce cuáles son las causas que propician los abatimientos antes mencionados; sin embargo, es indiscutible que la regulación de las estirpes celulares inmunológicas locales y periféricas se lleva a cabo por un complejo sistema de moléculas (interleucinas, factores de crecimiento, interferones, hormonas, etc.) que son sintetizadas por células locales y de tránsito, las cuales ejercerán diversos estímulos sobre las células diana, hasta que se alcance el acuerdo molecular que se traducirá como la capacidad específica de una célula de proliferar, migrar, ejercer su función efectora.

En cuanto a la actividad efectora de la respuesta inmunológica, se sabe que se manifiesta a través de dos grandes brazos. El brazo celular está modulado por la subpoblación de linfocitos T cooperadores denominados tipo TH-1, que promueven principalmente actividad citotóxica e inflamatoria y reciben esta clasificación debido a la síntesis aparentemente restringida de las citocinas interleucina-2 (IL-2), interferón-gamma (INF-γ) y linfotoxina (LT). Por otro lado, el brazo humoral es modulado por la subpoblación de linfocitos denominados TH-2, que a partir de la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-10 estimulan la producción de anticuerpos por células plasmáticas. Se sabe que la regulación de ambos fenotipos se lleva en forma cruzada, ya que las citocinas del tipo TH-1 abaten la actividad del tipo TH-2 y viceversa.[25-27]

La identificación de abatimiento en la actividad citotóxica de subpoblaciones de linfocitos T y de células NK en mujeres con endometriosis, puede ser el reflejo de un desequilibrio en la expresión de diversos moduladores inmunológicos donde las citocinas denominadas TH-1 y TH-2 desempeñan papeles preponderantes en la regulación final de la respuesta inmunológica.

■ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la fecha se desconoce la serie de mecanismos involucrados en la implantación y desarrollo de tejido endometrial en forma ectópica, sin embargo, diversas evidencias identificadas en mujeres con endometriosis en comparación con mujeres sanas fértiles, apuntan hacia la respuesta inmunológica como factor importante involucrado en el inicio y desarrollo de la patología, ya que se ha observado

por un lado un número mayor y grado de activación de macrófagos peritoneales, en asociación con disminución en la actividad efectora de linfocitos T (cooperadores y citotóxicos) y de células NK en el ambiente tanto periférico como peritoneal, las cuales son estirpes celulares asociadas a la regulación de actividad inmunológica, así como a actividad efectora de eliminación y remoción de células muertas, dañadas o desechos de éstas.

Sin embargo, a la fecha desconocemos cuáles son las causas involucradas en la aparente disminución de la respuesta citotóxica celular, que se presenta a nivel periférico y local en las mujeres que cursan con endometriosis. Desconocemos si el abatimiento de actividad inmunológica efectora, sea causa o consecuencia dentro del proceso fisiopatogénico del fenómeno, y dadas las condiciones en las que se identifica la patología; generalmente en mujeres estériles, resulta difícil asestar el momento en que la implantación ectópica se presentó y aún más, el estado inmunológico que guardaba el ambiente peritoneal y periférico de dichas mujeres.

Resulta imperante conocer de manera más cercana los eventos moleculares involucrados en la fisiopatogenia del fenómeno; sin embargo, las limitaciones técnicas, diagnósticas y éticas, nos impiden tener un abordaje directo para el análisis de marcadores celulares y solubles, que puedan señalar con precisión la participación de los elementos de la respuesta inmunológica local y periférica con el inicio y/o desarrollo de endometriosis.

■ OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre el desarrollo de tejido endometrial ectópico y el estado inmunológico sistémico, mediante la enumeración de subpoblaciones de linfocitos y síntesis intracelular de citocinas en linfocitos T involucradas en la regulación de la respuesta inmunológica, empleando un modelo murino de endometriosis.

■ OBJETIVOS PARTICULARES

1. Desarrollar un modelo de endometriosis peritoneal murino, utilizando la cepa de ratones Balb/c.
2. Cuantificar el porcentaje de linfocitos T totales (CD3+), T cooperadores (CD3/CD4+) y T citotóxicos (CD3+/CD8+) mediante citometría de flujo, en el bazo de los ratones empleados como modelo de endometriosis, así como en un grupo testigo.
3. Determinar mediante citometría de flujo la expresión de citocinas intracelulares: Interferón-gamma (INF-γ) e interleucina-2 (IL-2) en linfocitos T (CD3+), asociadas al patrón de promoción de respuesta citotóxica celular denominada TH-1.
4. Determinar mediante citometría de flujo la expresión de citocinas intracelulares: interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) en linfocitos T (CD3+), asociadas al patrón de promoción de respuesta humoral denominada TH-2.

■ MATERIAL Y MÉTODO

Desarrollo de modelo murino de endometriosis

Para el desarrollo del modelo murino de endometriosis, se emplearon ratones hembra de la cepa Balb/c, de 10 semanas de vida. Una vez alcanzada la edad deseada, los animales fueron anestesiados con ketamina 10 mg/mL y, en condiciones de asepsia, se les retiró el cuerno uterino derecho vía peritoneal. El cuerno uterino se colocó en medio de cultivo Dulbeco Modiefed Eagles Medium (DMEM, Gybco, BRL) adicionado de antibiótico antimicótico (Penn/Strep, Gybco, BRL). Utilizando un microscopio estereoscópico se realizaron fragmentos de 2 milímetros (mm) de longitud del cuerno uterino retirado. Este fragmento se implantó en el mismo ratón hembra del que se obtuvo. El implante consistió en la fijación del fragmento al peritoneo abdominal derecho con dos puntos separados de Vycril siete ceros, dejando en contacto el endometrio con el epitelio peritoneal. Posterior al implante se cerró el peritoneo con la misma sutura en surjete continuo y la pared abdominal con Nylon 3 ceros. Como grupo testigo se utilizaron ratones hembra de la misma cepa y características, a los cuales se les realizó la misma maniobra quirúrgica, sólo que se les implantó un fragmento de 2 mm de tejido adiposo de su propio mesenterio. Se utilizaron 10 ratones hembra para desarrollo del modelo al igual que para el grupo testigo. Una vez terminada la maniobra quirúrgica, los animales fueron regresados a sus jaulas, donde se observaron constantemente, con la intención de identificar signos de infección.

Ambos grupos de ratones hembras, se mantuvieron en condiciones óptimas de alimentación, con ciclos de luz/oscuridad de 12 x 12. El primero fue durante cinco semanas y el segundo durante

ocho semanas. Al término de este lapso los animales fueron sacrificados, se retiró el peritoneo donde se implantó el endometrio y se midió la superficie de crecimiento que presentaba, con el auxilio de un microscopio estereoscópico. Asimismo el bazo de cada animal fue extirpado y obtenidos los linfocitos para los experimentos de citometría de flujo.

Obtención de células mononucleares por gradiente de densidad a partir del bazo

Una vez sacrificados los animales mediante dislocación cervical, el bazo de cada uno de ellos fue retirado y colocado en una caja Petri que contenía RPMI suplementado con 10% de suero fetal de ternera y antibiótico antimicótico (Gybco, BRL), donde se eliminó el tejido sanguíneo y adiposo presente. Al término de esta operación el bazo fue colocado sobre una malla con un poro de 1 mm, y macerado gentilmente con el émbolo de una jeringa al mismo tiempo que se adicionaba medio de cultivo RPMI antes descrito. El bazo fue macerado en su totalidad recuperándose las células en el fondo de un tubo de plástico de 50 mililitros (mL). Al tubo donde se recuperaron las células se le adicionó una cantidad equivalente de medio RPMI, se mezcló suavemente y se centrifugó a 300 x g por 10 minutos; esta operación se repitió dos veces. El precipitado de la centrifugación final fue colectado en 6 mL de medio RPMI y colocado sobre 3 mL de Lymphoprep (Nycomed Pharma, Noruega) el tubo se centrifugó durante 30 mm, a 800 x g a temperatura ambiente. Al término de la centrifugación se recuperó el paquete celular formado en el tubo correspondiente a la banda de linfocitos, los cuales fueron lavados exhaustivamente con medio de cultivo RPMI (Gybco, BRL). El precipitado de la centrifugación final fue colectado en 1 mL de medio RPMI, alícuota a partir de la que se determinó el número de células mediante el empleo de un hematocímetro, así como la viabilidad que éstas mostraban utilizando azul de tripano como marcador de viabilidad. Las células recuperadas y contadas fueron procesadas para la identificación de subpoblaciones de linfocitos y citocinas intracelulares.

Análisis de linfocitos T totales, T cooperadores y T citotóxicos y citocinas intracelulares

A fin de poder verificar la presencia de citocinas intracelulares y las subpoblaciones de linfocitos, las células debieron de activarse con PMA-ionomicina, así como incubarse con un inhibidor del aparato de Golgi o estabilizador de proteínas intracelulares, en este caso brefeldina A. Así, las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C con 5% de CO_2 en presencia de brefeldina A (10 μg/mL,) y en presencia o ausencia de PMA (25 ng/mL) — lonomicina (1 μg/mL).

Una vez pasado el tiempo de incubación se colocaron, en un tubo de 12 x 75, 50 μL de la suspensión de células, activadas o no. Se colocaron 3 ul del anticuerpo anti-CD3 acoplado a CT-cromo. Se agitó e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se agregaron 50 mL de solución fijadora (Formaldehído a 6%). Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se agregaron 2 mL de buffer de lavado (PBA: Buffer de fosfatos 1 x, 0.5% de albúmina bovina y 0.1% de azida de sodio) a cada tubo. Se centrifugó por cinco minutos a 500 g, y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió la "pastilla" celular en volumen mínimo residual y se agregaron 50 mL de solución permeabilizadora. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado este tiempo se agregaron 10 mL de solución PBA y se centrifugó a 500 x g por 5 mm. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla celular se le agregaron 5 mL de anticuerpo anti-interleucina (IL) 2, o anti-IL-4, o anti-IL 10 o anti-interferón gamma. Se agitó y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiental en oscuridad. Posteriormente se agregaron 2 mL de PBA, se agitó y se centrifugó durante 10 minutos a 500 x g. Se decanta el líquido y se conserva un agregado celular que se resuspende en 100 mL de solución PBA y se procede a su captura y análisis en el citómetro de flujo, EPICS-ALTRA de COULTER.

■ RESULTADOS

Modelo de endometriosis murino

En el presente trabajo fue posible desarrollar un modelo de endometriosis, utilizando ratones hembra de la cepa Balb/c. Para decidir los tiempos óptimos de desarrollo del implante, se integraron dos grupos de estudio a los cuales se les realizó la misma maniobra de implantación de endometrio autólogo, siendo diferente el tiempo de desarrollo del implante. Para el grupo 1, se utilizaron 10 animales que se observaron durante cinco semanas, mientras que para el grupo 2 se dejaron en observación

ocho semanas. En ambos grupos se utilizaron 10 ratones como animales testigo. El peso promedio de los animales del grupo 1 antes de realizar el implante de endometrio fue de 21.36 ± 0.75 g, y al momento del sacrificio fue de 23.88 ± 0.83. Los valores para el grupo testigo fueron de 21.46 ± 0.67 g, el día de la cirugía y de 2 1.52 ± 1.54 g, antes de realizar el sacrificio. En ambos casos el análisis de los resultados no mostró diferencia estadística alguna, al comparar los pesos de los animales antes de realizar el implante y una vez transcurridas las cinco semanas. Asimismo, la comparación entre los pesos de los animales entre el grupo de estudio y el grupo testigo, antes y después de realizar la cirugía no mostró diferencia estadística alguna. Para el caso del grupo 2, el peso promedio de los ratones antes de realizar la implantación del tejido, fue de 21.76 ± 1.47 g, y de 23.02 ± 1.21 g, al momento de realizar el sacrificio de los animales. El grupo testigo mostró un peso promedio de 21.28 ± 0.70 g, antes de realizar la maniobra quirúrgica; y de 22.02 ± 1.17 g, al sacrificar a los animales. Al igual que en el grupo 1 antes descrito, no hubo diferencia estadística alguna antes y después de realizar el implante; ni entre los grupos de estudio y testigo.

Con respecto al desarrollo del tejido endometrial autólogo implantado en el peritoneo, se observó que el grupo 1 mostró un desarrollo de 25.4 ± 10.7 mm^2 y el grupo 2 un valor de 26.25 ± 6.29 mm^2, no se observó diferencia estadística significativa entre ambos grupos. Sin embargo, la dispersión identificada en el grupo 1 fue mayor, pues presentó un coeficiente de variación de 42%, frente al grupo 2 que muestra un valor de 24%. A partir de estos resultados, se decidió utilizar ocho semanas como tiempo de desarrollo del modelo de endometriosis para llevar a cabo los experimentos de subpoblaciones de linfocitos y expresión de citocinas.

Crecimiento de endometrio autólogo y porcentaje de linfocitos presentes en el bazo del modelo murino de endometriosis

La implantación del tejido endometrial autólogo en el modelo de endometriosis empleado en el presente estudio, mostró un desarrollo de 26.33 ± 10.76 mm^2, después de ocho semanas de implantación. Asimismo, la determinación de los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos mediante citometría de flujo, llevada a cabo en el bazo de los animales de estudio y testigo (ambos grupos, n= 10) se describen en el cuadro I.

Aunque existe cierta tendencia a que el porcentaje de linfocitos T totales y T cooperadores, sea mayor en los animales del modelo de endometriosis, en conjunción con disminución de los linfocitos T citotóxicos, no existe diferencia estadística alguna al comparar los resultados entre ambos grupos.

Identificación de citocinas intracelulares en linfocitos T obtenidos del bazo de los animales del modelo de endometriosis

El porcentaje de linfocitos T totales (CD3+) provenientes del modelo murino de estudio y del grupo de animales testigo, mostró los valores de síntesis de citocinas tanto basales como después de ser activados, señalados en el cuadro II.

El análisis de los porcentajes de linfocitos que expresaban las citocinas antes descritas, mostraron que para el caso del modelo de endometriosis, las células analizadas en forma basal expresaban todas las citocinas aquí estudiadas y que al ser estimuladas eran capaces de incrementar su producción. En ninguno de los casos fue posible observar diferencia estadística alguna, al comparar los porcentajes de células sin y con estimulación. Un patrón similar fue observado para el caso de los linfocitos provenientes del grupo testigo, donde con excepción de IL-10 donde no se detectó síntesis alguna por parte de las células analizadas con y sin estimulación, las restantes citocinas analizadas vieron incrementada su síntesis cuando los linfocitos T recibieron el estímulo. Para el caso de IL-4, la cual fue

Cuadro I

Subpoblaciones de linfocitos identificados en el bazo del modelo murino de endometriosis y grupo testigo, y crecimiento de tejido endometrial después de ocho semanas de desarrollo

	Linfocitos T totales (CD3+) (%)	Linfocitos T cooperadores (CD3+/CD4+) (%)	Linfocitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (%)	Crecimiento de tejido endometrial (mm^2)
Endometriosis	75 ± 16	57 ± 12	17 ± 7	26.3 ± 10.7
Testigo	66 ± 7	49 ± 6	21 ± 3	—

Cuadro II

Porcentajes de linfocitos obtenidos del bazo del modelo murino de endometriosis y testigo, expresando las citocinas interferón-gamma (INF-γ); Interleucina-2 (IL-2); Interleucina-4 (IL-4) e Interleucina-10 (IL-10) en forma basal y estimulados con PMA, identificados por citometría de flujo

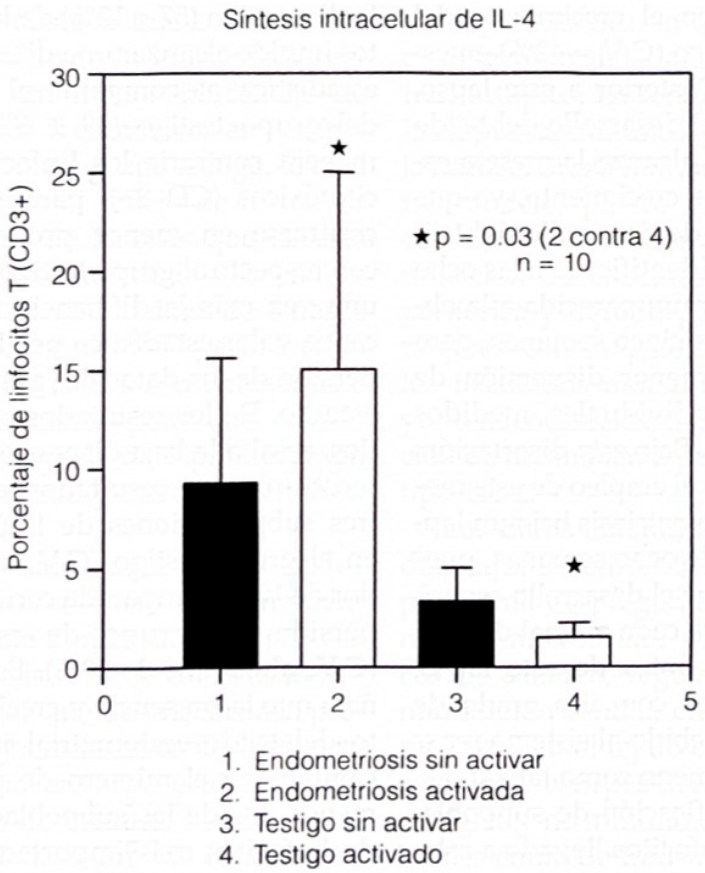
Citocina	Endometriosis linfocitos T (CD3+) (%)		Testigo linfocitos T (CD3+) (%)	
	Basal	Activadas	Basal	Activadas
INF-γ	0.40 ± 0.29	1.97 ± 2.32	0.40 ± 0.28	0.95 ± 1.34
IL-2	0.45 ± 0.31	5.20 ± 5.72	0.45 ± 0.35	6.75 ± 2.19
IL-4	9.40 ± 6.23	15.27 ± 9.76	3.25 ± 2.05	1.42 ± 0.99
IL-10	0.05 ± 0.10	0.13 ± 0.05	0.0	0.0

detectada tanto en las células sin estímulo y con estímulo, se observó que en el modelo murino, su producción se incrementó en casi 100% al recibir la estimulación en comparación con las células provenientes del grupo testigo, donde la estimulación no tuvo mayor efecto sobre los linfocitos T analizados. Esta mayor producción de IL-4 por parte de los linfocitos estimulados del grupo de estudio, generó una diferencia estadística ($p < 0.05$: Mann-Whitney) al compararlos con la producción realizada por los linfocitos estimulados del grupo testigo (Figura 1).

■ DISCUSIÓN

En el presente estudio fue posible desarrollar un modelo de endometriosis murino, utilizando ratones hembra de la cepa Balb/c de 10 semanas de vida. Para el desarrollo del modelo se empleó endometrio autólogo obtenido del cuerno uterino derecho de cada uno de los animales, implantándose 2 mm del cuerno uterino medido longitudinalmente, sobre la cavidad derecha peritoneal. Por otro lado, el desarrollo homogéneo que mostraron los ratones a las 10 semanas de vida, momento en el que se realizó la implantación del tejido endometrial (peso del lote 21.36+/-0.75 g) determinó que el área de tejido endometrial implantada fuese muy parecida, pues una vez que el cuerno uterino se seccionaba para implantar la cara endometrial sobre el peritoneo, el ancho que mostraba el cuerno abierto era de aproximadamente 2 mm; sumados a los 2 mm longitudinales seccionados, obteníamos un área total de 4 mm^2 a implantarse. Sin embargo, con la intención de obtener la mayor reproducibilidad en las variables a analizar, se decidió utilizar dos tiempos de desarrollo de endometriosis, los cuales fueron de cinco y ocho semanas. En ambos casos fue posible observar

Figura 1



Síntesis de interleucina-4 por linfocitos T totales (CD3+) en forma basal y estimulados obtenidos del bazo del modelo de estudio y grupo testigo.

crecimiento del endometrio ectópico, mediante histopatología se pudieron identificar características morfológicas de glándulas, arterias y tejido endometriales. El desarrollo que presentó el endometrio ectópico para el grupo de cinco semanas (25.4 ± 10.7 mm^2) no presentó diferencia estadística alguna con el valor de desarrollo que presentó el grupo de estudio a las ocho semanas (26.25 ± 6.29 mm^2); sin embargo, el coeficiente de variación para el grupo de ocho semanas representa la mitad del identificado en el grupo de cinco semanas. Estos valores parecen indicar que el desarrollo del tejido endometrial ectópico para el caso de nuestro modelo se estabilizan después de las cinco semanas y por ende es que vemos la mayor dispersión en el crecimiento del tejido ectópico (C.V. = 42%) en este tiempo. Posterior a este lapso, parece que el desarrollo del tejido endometrial alcanza la meseta estacionaria de crecimiento, ya que el área total de desarrollo del tejido ectópico identificada a las ocho semanas es muy parecida a la observada a las cinco semanas, pero existe una menor dispersión de los datos individuales medidos (C.V. = 24%). Bajo esta disertación, proponemos el empleo de este modelo de endometriosis bajo un lapso mínimo de ocho semanas, pues es posible que el desarrollo específico que sufra cada animal del tejido ectópico antes de este lapso, arroje valores con alto grado de dispersión debido al sistema *per se* y no al fenómeno como tal.

La identificación de subpoblaciones de linfocitos llevada a cabo en el bazo de los ratones de estudio y testigo, se pudo realizar sin problema, observándose valores de viabilidad en todos los casos mayores a 90%, muestras en las que se llevaron a cabo los experimentos de citometría de flujo. Para el caso de los linfocitos T totales (CD3+), se observó una mayor proporción de esta subpoblación linfocitaria en el bazo de los ratones hembra del modelo en comparación con el observado en el grupo testigo. Aunque el porcentaje de linfocitos se encuentra casi 10% arriba, la dispersión que mostraron los resultados alcanza un valor de ± 16%, lo que tiene impacto en el análisis estadístico ya que no se observa diferencia alguna. El mismo caso acontece para los linfocitos T cooperadores (CD4+), que se encuentran en mayor proporción en las muestras provenientes del grupo de estudio, pero la dispersión (57 ± 12%) de los datos impide alcanzar una diferencia estadística al comparar el valor del grupo testigo (49 ± 6%). De manera contraria los linfocitos T citotóxicos (CD 8+), parecen encontrarse en menor proporción con respecto al grupo testigo, pero una vez más la diferencia no alcanza valor estadístico por la dispersión de los datos del grupo de estudio. De los resultados obtenidos, resalta la baja dispersión que mostraron los resultados en las tres subpoblaciones de linfocitos en el grupo testigo (C.V., alrededor de 10%) comparada con la dispersión del grupo de estudio (C.V., alrededor de 20%). Esto señala que la presencia y crecimiento del tejido endometrial induce cambios en el número de por lo menos dos de las subpoblaciones de linfocitos más importantes (T cooperadores y T citotóxicos), las cuales en su conjunto regulan y coordinan la actividad inmunológica efectora. En cuanto a la actividad efectora, se sabe que la respuesta inmunológica se manifiesta a través de dos grandes brazos. El brazo celular está modulado por la subpoblación de linfocitos T cooperadores (CD4+) denominados tipo TH-1, que promueven principalmente actividad citotóxica e inflamatoria y reciben esta clasificación debido a la síntesis aparentemente restringida de las citocinas interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (INF-γ) y linfotoxina (LT). Por otro lado, el brazo humoral es modulado por la subpoblación de linfocitos denominados TH-2, quienes a partir de la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-10 estimulan la producción de anticuerpos por células plasmáticas. Se sabe que la regulación de ambos fenotipos se lleva en forma cruzada, ya que las citocinas del tipo TH-1 abaten la actividad del tipo TH-2 y viceversa. Es decir que una mayor proporción de las citocinas del tipo TH-2 promoverá un abatimiento de la función citotóxica que deben ejercer estirpes como linfocitos T citotóxicos (CD8+) y células NK. Por otro lado una mayor proporción de las citocinas denominadas del tipo TH-1, inhibirán la síntesis de anticuerpos y propiciarán una mayor actividad citotóxica por las subpoblaciones antes mencionadas.

En nuestro estudio observamos que los linfocitos T totales (CD3+) de ambos grupos de estudio, donde incluimos la subpoblación de linfocitos T cooperadores y T citotóxicos, producen en forma basal casi la misma cantidad de las citocinas denominadas TH-1 (INF-γ e IL-2), y al ser estimuladas se presenta un aumento en cuanto a la expresión de éstas, pe-

ro los valores son muy parecidos y no es posible observar diferencia estadística alguna al comparar ambos grupos ni en forma basal ni activados. Por otro lado, fue posible identificar la expresión de las citocinas TH-2 (IL-4 e IL-10) solamente en los linfocitos provenientes del modelo de endometriosis, ya que en los animales del grupo testigo, no fue posible detectar IL-10 en forma basal o después de estimular las células. Asimismo, fue posible observar una fuerte tendencia a que los linfocitos del modelo de estudio en forma basal, produzcan una mayor cantidad de IL-4 al comparar el valor con el obtenido en el grupo testigo respectivamente (9.40 ± 6.23% contra 3.25 ± 2.05%), obteniéndose un valor marginal de diferencia estadística quizá una vez más por la dispersión que presentan los valores del grupo de estudio. Sin embargo, cuando las células fueron estimuladas fue posible identificar claramente una mayor síntesis de esta citocina en las células del modelo de endometriosis comparadas con el grupo testigo (15.27 ± 9.76% contra 1.42 ± 0.99%) respectivamente, obteniéndose una diferencia estadística significativa ($p = 0.03$).

Los datos antes descritos en su conjunto, señalan la inducción de cambios que acontece en los animales que presentan el implante endometrial. Por un lado, es posible identificar una mayor cantidad de linfocitos T totales (CD3+), lo cual puede ser la respuesta inmunológica que se está promoviendo en contra del tejido ectópico bajo crecimiento, ya que este marcador incluye tanto a linfocitos T citotóxicos y T cooperadores, los cuales en su conjunto representan la parte efectora y de coordinación de dicha respuesta. Sumado a esto, el valor de linfocitos T cooperadores (CD4+), los cuales dirigirán la respuesta en cualquiera de las dos grandes vías efectoras, ya sea citotóxica (TH-1) o humoral (TH-2), presentan una tendencia a encontrarse en mayor proporción en los animales del modelo de endometriosis, lo cual refuerza la idea de una mayor actividad inmunológica, que según los datos obtenidos en nuestro estudio, están preponderantemente dirigiendo la respuesta inmunológica hacia el tipo humoral o TH-2, lo cual tiene como efecto el abatimiento de la actividad citotóxica de linfocitos T citotóxicos y células NK. Al respecto, y de manera acorde con las ideas antes descritas, se observa que las muestras del modelo de endometriosis, presentan un menor porcentaje de linfocitos T citotóxicos en comparación con el grupo testigo, lo cual puede ser el reflejo de la mayor cantidad de síntesis que se está llevando a cabo de IL-4, la cual es una fuerte inhibidora de síntesis de las citocinas INF-γ e IL-2 (tipo TH-l), las cuales son necesarias e indispensables para que células citotóxicas puedan proliferar en forma clonal y ejercer su función efectora.

Los datos aquí mencionados identifican de manera contundente y hasta donde sabemos por vez primera la serie de cambios inmunológicos que desencadena la presencia y crecimiento de tejido endometrial en forma ectópica en un modelo de estudio. Mucho se ha especulado sobre las condiciones imperantes del ambiente peritoneal de las mujeres que presentan esta patología, donde las evidencias señalan que una deficiente actividad de funciones efectoras y reguladoras de la actividad inmunológica puede conducir a la implantación del tejido ectópico; sin embargo, se desconoce si la alteración inmunológica existe antes de que se dé la adherencia, implantación y desarrollo del endometrio ectópico, o si éste bajo condiciones específicas, es capaz de abatir la respuesta celular citotóxica local que debe imperar, para eliminar células y tejido que constantemente arriba a la cavidad peritoneal en cada ciclo menstrual.[28-33] En el modelo de endometriosis aquí empleado, los datos indican que la presencia del tejido *per se*, promueve una regulación de la respuesta inmunológica hacia el brazo humoral, con el consiguiente abatimiento de la actividad citotóxica, lo que permite el desarrollo del tejido endometrial ectópico. La tendencia a que la respuesta inmunológica se dirija hacia el brazo humoral en nuestro modelo, parece estar acorde con datos observados de la determinación de citocinas en sangre periférica y líquido peritoneal de mujeres con la patología, donde los resultados muestran una mayor tendencia hacia mayor promoción de un ambiente peritoneal del tipo TH-2.

Los datos obtenidos en el modelo aquí descrito, abren una amplia gama de preguntas sobre los mecanismos locales y/o periféricos de diálogo, regulación y comunicación celular, entre estirpes presentes en el tejido endometrial ectópico y estirpes del tipo inmunológico y no inmunológico, tanto locales como de tránsito, que conlleve a la regulación inmunológica en una dirección y/o en asociación con el desarrollo y crecimien-

to del endometrio ectópico. Por otro lado, las réplicas que pudieran presentarse sobre comparaciones y similitudes entre el modelo de endometriosis aquí descrito y el fenómeno como tal en la especie humana, sabemos a ciencia cierta que los mecanismos de regulación inmunológica son muy parecidos en los mamíferos superiores y, aún más, los mecanismos del modelo animal empleado son bastante similares con respecto a los que presenta el humano; por lo que es posible realizar con su proporción analogías entre ambos fenómenos. De aquí que el empleo del modelo de endometriosis puede ayudar al conocimiento de la etiopatogenia del fenómeno en humanos, al permitir realizar investigación dirigida, coordinada, reproducible y manipulable al respecto.

■ CONCLUSIONES

El modelo murino de endometriosis desarrollado utilizando la cepa de ratones hembra Balb/c, mostró una menor dispersión en el valor de crecimiento del tejido ectópico, implantado en el peritoneo a las ocho semanas de desarrollo.

La presencia de tejido endometrial en la cavidad uterina en el modelo aquí descrito, induce cambios en el número y actividad de linfocitos T cooperadores y T citotóxicos y modula la respuesta inmunológica hacia el tipo TH-2, a partir de una mayor síntesis de interleucina-4, identificada en linfocitos T totales (CD3).

La promoción de la respuesta inmunológica hacia el tipo TH-2 en el modelo de endometriosis, puede estar relacionada con la permanencia y desarrollo del tejido endometrial ectópico. ■

■ REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Robert S. Schenken. Endometriosis. Clinical Obstetrics and Gynecology 1999; 42:3.
2. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Obstet Gynecol 1927; 14:422-69.
3. Ramey JW, Archer DF. Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis. Fertil Steril 1993; 60:1-14.
4. Blumenkrantz MK, Gallagher N, Bashore RA, Tenchkoff H. Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dyalysis. Obstet Gynecol 1981; 57: 667-70.
5. Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstet Gynecol 1984; 64:151-54.
6. Merrill JA. Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. Am J Obstet Gynecol 1966; 94: 780-9.
7. Zamah NM, Dodson MG, Stephens LC, Buttram VC, Besch PK, Kaufman RH. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic mice. Am J Obstet Gynecol 1984; 149:591-7.
8. Nava-Loya G, Hernández-Guerrero C, Pérez-Ocharán M, Mojarra-Estrada JM, González ME, Bustos-López H, Vadillo-Ortega F. Respuesta Inmune Peritoneal en Endometriosis. Ginec Obstet Mex 1996; 64: 147-53.
9. Rier S, Yeaman G. Immune aspects of endometriosis: releance of the uterine mucosal immune system. Semin Reprod Endocrinol 1997; 15:209-20.
10. Giudice L, Tazuke S. Status of current on endometriosis J Reprod Med 1998; 43:252-62.
11. Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24:219-33.
12. Hill J. Immunology and endometriosis. Fact, artifact or epiphenomenon? Obstet Gynecol Clin North Am 1997; 24:291-306.
13. Ryan I, Taylor R. Endometriosis and infertility: new concepts. Obstet Gynecol Surv 1997; 52:365-71.
14. Hill JA, Faris HM, Schiff I, Anderson DJ. Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril 1988; 50: 216-22.
15. Iwasaki K, Makino IK, Matsubayashi MT, Yokokura TA. Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis. J Fertil Menopausal Stud 1993; 38:229-34.
16. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR. Flow Cytometry Analysis of Lymphocyte Subpopulations in Peritoneal Fluid of Women With Endometriosis. Am J Reprod Immunol 1994; 31:25-31.
17. Opsahl MS, Clifford CH, Klein TH, Cunningham DS. Characterization of Peripheral Blood and Peritoneal Fluid Mononucleár Cell Subsets in Fertile and Infertile Women. Obstet Gynecol 1994; 37:176-79.
18. Melioli G, Semino C, Semino A, Venturini PL, Ragni N. Recombinant Interleukin-2 corrects *in vitro* the immunological defect of endometriosis. Am J Reprod Immunol 1993; 30:218-27.
19. Umesaki N, Tanaka T, Miyama M, Mizuno K, Kawuamura. Increased natural killer cell in patients treated with gonadotropin releasing hormone agonist. Gynecol Obstet Inves 1999; 48:66-8.
20. Somigliana E, Vigano P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function. Hum Reprod Update 1999; 5:40-51.
21. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D, Munnery L, Wood EC. Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients: relationship to disease pathogenesis. Fertil Steril 1994; 62:1086-88.
22. Ho H, Wu M, Yang Y. Peritoneal immunity and endometriosis. Am J Reprod Immunol 1997; 38:400-12.
23. Garzetti G, Ciavattini A, Provinciali M, Fabris N. Natural killer cell activity in endometriosis: Correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. Obstet Gynecol 1993; 81:665-68.
24. Oosterlynck DJ, Lacquet FA, Waer M, Koninckx PR. Lymphokine activated killer activity in women with endometriosis. Obstet Gynecol 1994; 37:185-90.

25. Abbas AK, Lichtmann HA, Pober JA. En: Cellular and Mollecular Immunology. W. B. Saunders Company. 1994. PP 267-92.
26. Katasikis PD, Cohen BA, Londei M, Feldmann M. Are CD4 + THl cell pro inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL- 10 to IFN- or IL-2 determines their function. Inter Immunol 1995; 7:1287-94.
27. Mosmann TM, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more. Immunology Today 1996; 17:138-46.
28. Matalliotakis I, Neonaki M, Zolidaki Hassaan E. Changes in immunological variables TNF-α, sCD8 and sCD4 during danazol treatment in patient with endometriosis. Int J Fertil Womens Med 1997; 42:211-4.
29. Zhang R, Wild R, Ojago J. Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cell: an *in vitro* system. Fertil steril 1993; 59:1196-201.
30. Mori H, Sawari M, Nakawana M, Itoh N, Tamaya T. Peritoneal fluid interleukin- 1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecolic disease. Am J Reprod Immunol 1991; 26:62-7.
31. Ho H, Wu M, Chao K, Chen S, Chen F. Decreased in interferon gamma production and impairment of T-lymphocyte proliferation in peritoneal women with endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1996; 75: 1236-41.
32. Overton C, Fernandez-Shaw S, Hicks B, Barlow D. Peritoneal fluid cytokines and the relationship with endometriosis and pain. Hum Reprod 1996; 11:380-6.
33. Wu M, Ho H, Che S, Chao K, Chen C. Increase in the production of interleukin-6, interleukin-10 and interleukin 12 by lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages from women with endometriosis. Am Reprod Immunol 1999; 41:106-11.

Alteración en los potenciales de membrana mitocondrial y su relación exponencial con la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática como marcadores en los eventos iniciales de apoptosis: evaluación en diferentes fracciones espermáticas

■ Dr. Gerardo Barroso Villa,[1] Dr. Samuel Karchmer Krivitzky,[1] Dr. Ernesto Castelazo Morales,[1] Dra. Esperanza Carballo Mondragón,[1] Dr. Alberto Kably Ambe[1]

■ **RESUMEN**

Objetivo. Determinar la integridad de la membrana plasmática a través de la translocación de fosfatidilserina (FS) en dos fracciones espermáticas y su correlación con los potenciales de membrana mitocondrial espermática. ***Material y método.*** El análisis de dos fracciones espermáticas fue llevado a cabo con la separación de gradientes de discontinuidad con Percoli, para la obtención de dos muestras de alta y baja movilidad (90-40%). Doce pacientes fueron reclutados para la valoración inicial de los parámetros seminales. La determinación en la integridad de la membrana mitocondrial fue llevada a cabo con la utilización de un segundo anticuerpo (Mitosensor) el cual fue analizado bajo microscopia fluorescente en donde un promedio de 200 células fueron evaluadas, para el análisis se utilizó un filtro de excitación de 450-490 nm. La evaluación citoplasmática fue llevada a cabo por la unión de anexina V a la FS, para la determinación de los eventos iniciales de muerte celular. Fueron aplicadas pruebas no paramétricas para determinar las diferencias entre los potenciales mitocondriales y los procesos de membrana plasmática. Fueron utilizadas pruebas de correlación lineal en la relación de anexina V y mitosensor. ***Resultados.*** Por diseño de estudio, se manifestaron diferencias en cuanto a los parámetros de desplazamiento y la presencia de apoptosis tanto en la membrana plasmática como en los potenciales de membrana mitocondrial. Se encontró una correlación positiva entre la función mitocondrial y la función de membrana citoplasmática. ***Conclusiones.*** Éste es el primer estudio en donde se hace un análisis comparativo entre la función de membrana mitocondrial y la expresión de FS por parte del citoplasma como marcadores de muerte celular en forma temprana. Es probable que la población de infertilidad masculina esté asociada con un incremento en este tipo de procesos de apoptosis.

Palabras clave: Potenciales de membrana mitocondrial, translocación de fosfatidilserina, membrana plasmática, marcadores, apoptosis, fracciones espermáticas.

(Barroso Villa G. *et al.* Alteración en los potenciales de membrana mitocondrial y su relación exponencial con la translocación de fosfatidilserina en la membrana plasmática como marcadores en los eventos iniciales de apoptosis: evaluación en diferentes fracciones espermáticas. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 182).

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

■ **ABSTRACT**

Objective. *To determine the integrity of the plasmatic membrane through phosphatydylserine (PS) translocation in two spermatic fractions and their correlation with the spermatic mitochondrial membrane potential.* ***Material and methods.*** *The analysis of both spermatic fractions was carried out through a discontinuous gradient separation with Percoli, in order to obtain two samples with high and low mobility (90-40%). Twelve patients were recruited for the inital evaluation of seminal parameters. Mitochondrial membrane integrity was determined using a second antibody (Mitosensor), and was analyzed by fluorescence microscopy, evaluating an average of 200 cells. A 450-490 nm excitation filter was used for this analysis. Cytoplasmatic assessment was carried out by anexine V bonding to PS, in order to determine the initial events of cellular death. Non parameter tests were used in order to determine the differences between mitochondrial potentials and plasmatic membrane processes. Linear correlation tests were used for the anexine V and Mitosensor ratios.* ***Results.*** *Due to the study's design, some differences were observed regarding the displacement parameters and the presence of apoptosis, both, in the plasmatic membrane and in mitochondrial membrane potentials. A positive correlation between both, mitochondrial and cytoplasmic membrane functions was also found.* ***Conclusions.*** *This is the first study performing a comparative analysis between mitochondrial membrane function and cytoplasmatic PS expression as early cellular death markers. The male infertility population is probably associated with an increase in this kind of apoptosis processes.*

Key words: mitochondrial membrane potentials, phosphatydylserine translocation, plasmatic membrane, markers, apoptosis, spermatic fractions.

(Barroso Villa G. *et al.* The alteration of mitochondrial membrane potential and its exponential relationship to phosphatydylserine translocation in the plasmatic membrane as markers in the initial events of apoptosis: its evaluation in different spermatic fractions. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 182).

■ INTRODUCCIÓN

Es probable que una de las características esenciales en el desarrollo de las especies sexuadas sea el proceso de selección, que se encuentra determinado a través de diversos mecanismos de regulación, tanto en su medio, como en el contexto microambiental de ciertas funciones de orden intracelular.

El proceso de apoptosis también conocido como muerte celular programada juega un papel esencial en la homeostasis y desarrollo de todos los tejidos dentro del organismo. En contraste con la necrosis (muerte celular por inducción), la apoptosis se presenta como un proceso fisiológico bien regulado. Cualquier desajuste en el balance entre la proliferación celular y su control a través de este proceso de muerte celular mantenido por la apoptosis puede resultar en serias enfermedades, principalmente el cáncer. De la misma manera es muy probable que estos estén relacionados con los procesos evolutivos en cuanto a la distribución del material genético durante la fertilización entre especies.

La apoptosis se define bajo condiciones biomoleculares como un sistema de alto rendimiento energético (ATP-dependiente) ya que requiere para su función el consumo en forma apreciable de energía intracelular, a diferencia de la necrosis en donde los procesos pasivos de energía se encuentran presentes; además de relacionarse en forma directa con una respuesta inflamatoria significativa, lo que no sucede en la apoptosis. Ésta es una condición importante de definir para identificar diferencias entre cada uno de éstos para su entendimiento posterior.

Los fenómenos reproductivos no escapan a la intervención de estos eventos de regulación en donde se involucra desde el desarrollo de las células germinales —señalando dentro de esto la espermatogénesis y ovogénesis—, desarrollo y maduración folicular, hasta la interacción de gametos con la consiguiente fertilización e implantación endometrial.

En el ámbito ovárico es conocido que los eventos de "dominancia" y "atresia folicular" son regulados por estos mecanismos dentro de las células de la granulosa, además de relacionarse con el desarrollo, maduración, ovulación y luteinización folicular.

De la misma manera, la apoptosis tiene control en la meiosis temprana de las células germinales en el testículo. Pacientes masculinos que cursan con infertilidad inexplicable presentan un incremento en el daño a nivel del ácido desoxirribonucleico (ADN) y su consecuente fragmentación en oligonucleosomas dentro de las células espermáticas.

Un número de eventos cruciales en los fenómenos apoptósicos inicia dentro de la mitocondria.[1] Las mitocondrias envainan la pieza media del espermatozoide proveyendo trifosfato de adenosina (ATP) al axonema donde es utilizado para la propulsión flagelar. Estos organelos son requeridos para la obtención de un metabolismo eficiente, producción de energía, producción de lípidos de membrana y crecimiento celular, pero también son determinantes primarios de vida o muerte celular.[2]

La relación de la mitocondria con el proceso de apotosis está dada por diversos mecanismos. Esto incluye la activación de la familia de cistein-proteasas conocidas como caspasas, un ejemplo es el citocromo-c y la disrupción de la cadena de transporte de electrones los cuales permiten cambios en la fosforilación oxidativa y síntesis de ATP.[3] Otro de los mecanismos es la pérdida en los potenciales de membrana, variaciones en los potenciales de óxido-reducción (redox) celular con la participación de familias proteicas pro y antiapoptósicas (i.e. Bcl-2). Aunque la apoptosis no es considerada como un fenómeno dependiente de la fosforilación oxidativa, la mitocondria funciona como coordinador apoptósico en diversos sistemas celulares.

El objetivo del presente estudio es determinar la integridad de membrana plasmática a través de la translocación de fosfatidil-serina (FS) en dos fracciones espermáticas y su correlación con los potenciales de membrana mitocondrial espermática.

■ MATERIAL Y MÉTODO

Colección de la muestra seminal

Este estudio fue llevado a cabo bajo la aprobación de Comité de Investigación y Ética del Hospital Ángeles de las Lomas. Las muestras seminales fueron obtenidas de pacientes masculinos que cursaron con infertilidad. Todos los pacientes tuvieron el antecedente de infertilidad al menos por un año, a los cuales se les realizó exploración física. El único criterio de exclusión fue la presencia de $< 10 \times 10^6$ espermatozoides totales móviles en la muestra original. Los pacientes (n=12) recolectaron la muestra espermática por masturbación dentro de frascos estériles después de tres a cinco días de abstinencia. Las características seminales de volumen, pH y aglutinación fueron normales; todas las muestras tuvieron más de 1×10^6 células redondas por mililitro y cultivos negativos para microorganismos.

Preparación seminal

Las muestras fueron preparadas utilizando dos gradientes de Percoli en forma discontinua (90-40% Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). Cada porción de semen postlicuefacción fue colocada en la parte superior de los gradientes de concentración y centrifugado a 400 g por 15 minutos. Posterior a la centrifugación se obtuvieron dos poblaciones purificadas de: alta movilidad (gradiente de 90%) y baja movilidad (gradiente de 40%), las cuales fueron lavadas con fluido tubario humano (HTF) y resuspendido a una concentración de 2.5×10^6 espermas por mililitro.

Evaluación de la morfología espermática

La morfología espermática fue evaluada utilizando el criterio estricto propuesto por Kruger. La muestra (5 μL) fue esparcida dentro del portaobjetos, la cual permaneció por 20 minutos para su secado antes de la tinción. La tinción se llevó a cabo utilizando Diff-Quick (Baxter Dade Diagnostics AG, Dubingen, Switzerland). Éstas se mantuvieron por 30 minutos a temperatura ambiente antes de colocárseles un cubreobjetos largo. La evaluación morfológica fue realizada bajo magnificación con objetivo de inmersión x 100 en donde un promedio de 100 espermatozoides fueron evaluados por cada laminilla. El resultado fue expresado en porcentaje de las células espermáticas observadas por cada una de ellas.

Para la evaluación de normalidad por criterio estricto, el espermatozoide debió observar una configuración ovalada en donde se definiera una incorporación acrosómica adecuada de 40-70% de la cabeza espermática, y que no observara defectos en la pieza media, cuello o cola.

Determinación de la integridad funcional mitocondrial espermática

La integridad funcional mitocondrial del esperma, la cual es indicativa de apoptosis en estadios iniciales fue analizada utilizando Apoalert™ Mitocondrial Membrane Sensor Kit (Mitosensor: Clontec Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA). Este permite la detección de los cambios en los potenciales transmembrana a nivel mitocondrial en los fenómenos iniciales de apoptosis.

La muestra seminal fue colocada en tubos tipo Eppendorf (sigma) y centrifugadas a 200g por cinco minutos. Las muestras fueron resuspendidas en 1 μL de Mitosensor buffer, el cual fue mezclado e incubado a 37°C y 5% de CO_2 en la oscuridad. Mitosensor (1 μL) fue añadido por 10 minutos posteriores al periodo de incubación.

El porcentaje de células con disfunción mitocondrial fue determinado bajo microscopia fluorescente, en donde un promedio de 200 células fueron evaluadas por cada una de las muestras. Las muestras fueron observadas con un microscopio epifluorescente utilizando un filtro de excitación de 450-490 nm. En células normales —las cuales no exhiben datos de muerte celular— Mitosensor se agrega a éstas presentando un color fluorescente rojo/anaranjado. En el caso de disfunción mitocondrial no se da una agregación del anticuerpo, por lo que la tinción permanece en su forma monomérica dentro del citoplasma presenta fluorescencia de color verde.

Evaluación citoplasmática a través de la anexina-V

Anexina-V es una proteína de unión fosfolipídica calcio-dependiente, la cual tiene una alta afinidad por la fosfatidil-serina (FS). Durante los eventos apoptósicos iniciales la membrana plasmática realiza la translocación de FS de la membrana interna hacia la membrana externa, la cual es reconocida por la anexina-V (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN, USA) durante este proceso de translocación. La adhesión de la anexina-V a las células apotósicas muestra una tinción fosforescente en verde. Algunas de las células necróticas llegan a escapar del análisis apoptósico, sin que se puedan diferenciar con las células normales y con estas últimas; por este motivo se agregó yoduro de propidio (VP) (tinción en rojo), el cual excluye aquellas células que muestran una translocación de anexina-V en la membrana plasmática.

Posterior a la separación de las fracciones de alta y baja movilidad, las células espermáticas fueron resuspendidas en PBS (sigma) e incubado con anexina-V en una solución buffer de HEPES (sigma) conteniendo VP. El análisis de la muestra se realizó bajo microscopia epifluorescente. Por lo menos 200 células fueron analizadas en forma aleatoria por campo identificada como normales (negativas para anexina-V y YP), apoptósicas (positivas para anexina-V y negativas para YP) o necróticas (positivas para YP).

■ ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Por el tipo de distribución de tipo no-Gausiano en la información obtenida la aplicación de pruebas no-paramétricas (U de Mann-Witney) fueron aplicadas para determinar las diferencias entre la disfunción en los potenciales mitocondriales y la conversión de FS en la membrana plasmática. Fueron aplicadas pruebas de correlación lineal en los resultados obtenidos a través del análisis de anexina-V y Mitosensor. Los resultados son presentados como el promedio ± su desviación estándar. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

■ RESULTADOS

Las características generales evaluadas en la muestra del eyaculado original muestran una concentración espermática de 304 ± 325 $x10^6$ (rango de 102-1,060) una movilidad progresiva total de 64.2 ± 7.3 (rango de 56 a 70%) y una morfología promedio de 7.5 ± 5.5 (rango entre 3 a 16%).

El cuadro I muestra los parámetros de desplazamiento para cada una de las fracciones, tanto para aquellas de alta movilidad (gradiente de Percoll a 95%) como para baja movilidad (gradiente de Percoll a 40%). La evaluación de movilidad progresiva fue significativamente mayor en la fracción de Percoll a 95%. El porcentaje de movilidad de cada fracción evaluada son expresadas en la figura 1 con base en su media y expresión en intercuartiles (25-75%).

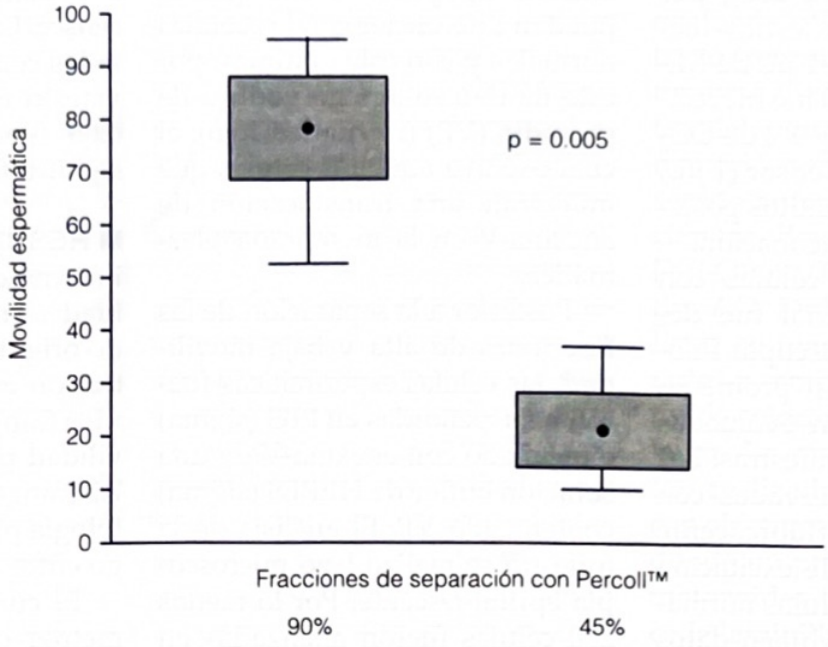
Los resultados en la valoración citoplasmática inicial determinada a través de la medición de anexina-V demostraron incremento en la fracción de baja movilidad

Cuadro I

Relación de los parámetros de desplazamiento y apoptosis en fracciones de alta y baja movilidad espermática

	Movilidad	Anexina-V	Potencial mitocondrial	Necrosis
Alta movilidad (90%)	88.2±3.1	8.0±5.2	10.5±5.0	10.1±5.4
Baja movilidad (45%)	6.2±2.1	12.1±7.1	29.0±9.7	27.5±9.5
P	0.005	0.02	0.0002	0.0006

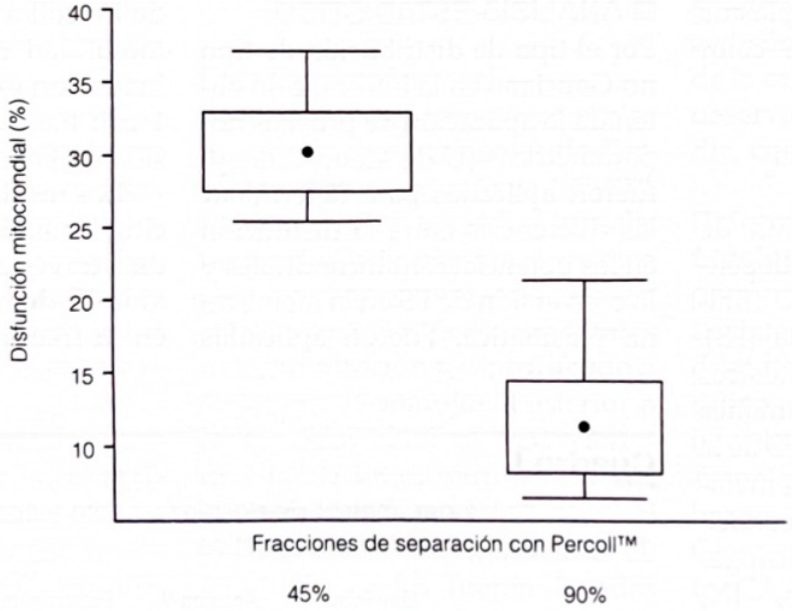
Figura 1



* Representación de la media y su expresión en intercuartiles (25% - 75%)

Parámetros de movilidad espermática por cada fracción de estudio

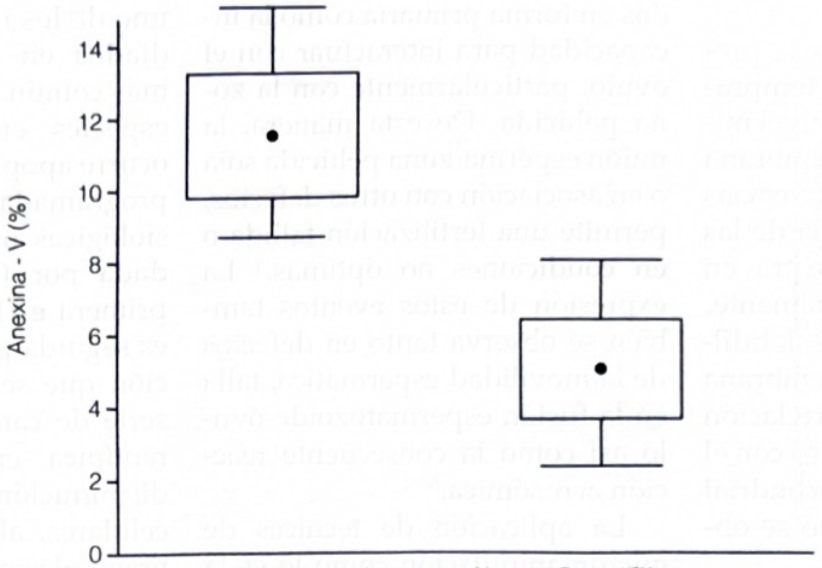
Figura 2



* Representación de la media y su expresión en intercuartiles (25% - 57%)

Disfunción en los potenciales de membrana mitocondrial en las diferentes fracciones

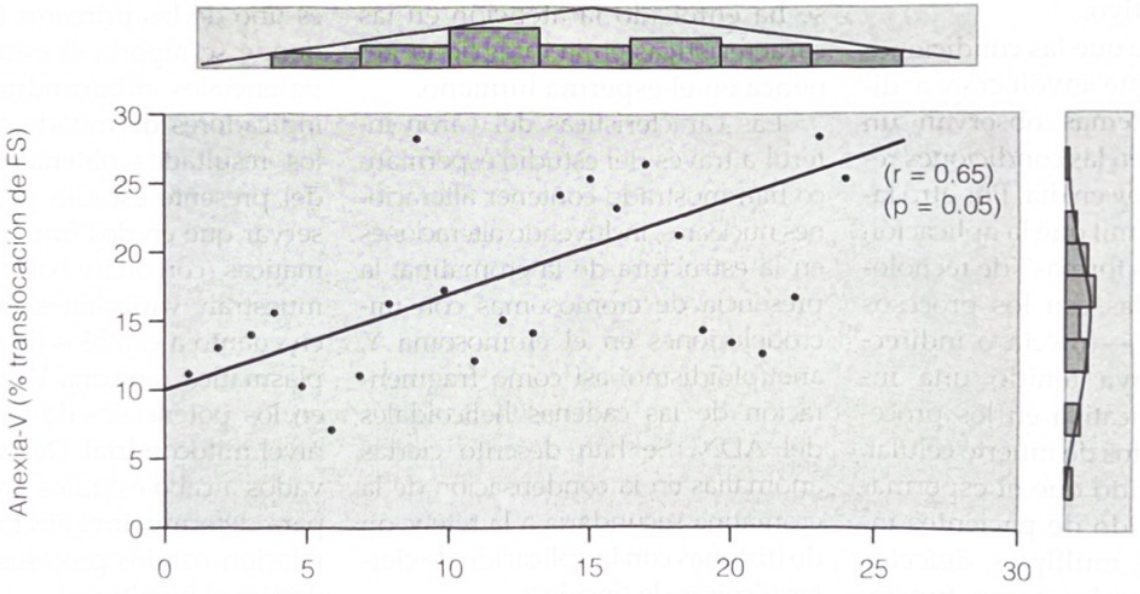
Figura 3



* Representación de la media y su expresión en intercuartiles (25% - 75%)

Relación en la distribución de PS translocada por fracciones de estudio

Figura 4



Correlación de los índices apoptósicos citoplasmáticos y de potenciales mitocondriales

(12.1 ± 7.1) con respecto a aquellas que mostraron una alta movilidad (8.0 ± 5.2) ($p < 0.005$).

El análisis en cuanto a la presencia de los indicadores tempranos de apoptosis (tanto a nivel mitocondrial como en la membrana plasmática) muestran diferencias significativas por cada una de las fracciones como se muestra en las figuras 2 y 3, respectivamente.

La translocación de fosfatidilserina a través de la membrana plasmática mostró una correlación positiva cuando se comparó con el grado de disfunción mitocondrial [($r = 0.65$) ($p = 0.05$) como se observa en la figura 4.

■ CONCLUSIONES

Hablar de apoptosis es referirse a los mecanismos reguladores involucrados en los procesos intracelulares en diversas especies de orden animal y vegetal. Estos sistemas homeostásicos no sólo involucran los diversos mecanismos de orden funcional, sino también en el ámbito reproductivo.

Es probable que las condiciones ambientales que involucran a diversos ecosistemas observan un efecto directo en las condiciones reproductivas hoy en día. Por otro lado, es inverosímil que la aplicación de las "nuevas formas" de tecnología relacionadas con los procesos reproductivos —directa o indirectamente— haya tenido una influencia significativa en los procesos programados de muerte celular.

Es reconocido que el espermatozoide obtenido de pacientes infértiles posee múltiples defectos tanto estructurales como funcionales. Bajo condiciones *in vitro*, estas anormalidades son manifestadas en forma primaria como la incapacidad para interactuar con el óvulo, particularmente con la zona pelúcida. De esta manera, la unión esperma-zona pelúcida sola o en asociación con otros defectos, permite una fertilización fallida o en condiciones no óptimas.[4] La expresión de estos eventos también se observa tanto en defectos de la movilidad espermática, falla en la fusión espermatozoide-óvulo así como la consecuente reacción acrosómica.[5]

La aplicación de técnicas de micromanipulación como lo es la inyección intracitoplasmática de esperma o ICSI, ha venido a remover barreras en la selección espermática que en otras circunstancias no hubieran permitido llevar a cabo la fertilización dentro de las técnicas de reproducción asistida. Debido a la transmisión de enfermedades genéticas a través de esta técnica de micromanipulación, se ha enfocado la atención en las características en la integridad genética en el esperma humano.

Las características del varón infértil a través del estudio espermático han mostrado contener alteraciones nucleares, incluyendo alteraciones en la estructura de la cromatina, la presencia de cromosomas con microdeleciones en el cromosoma Y, aneuploidismo, así como fragmentación de las cadenas helicoidales del ADN. Se han descrito ciertas anomalías en la condensación de la cromatina secundaria a la retención de histonas con la aplicación de ciertas técnicas de tinción.[6]

La fragmentación del ácido desoxirribonucleico genómico es uno de los indicadores más estudiados en apoptosis, la forma más común de muerte celular en especies eucariontes. También ocurre apoptosis o muerte celular programada bajo condiciones fisiológicas normales, la cual está dada por fases principales. La primera es la fase de inicio, que es seguida por una fase de ejecución que se caracteriza por una serie de cambios de forma estereotípica, en donde se observa disminución en las dimensiones celulares, alteración de la membrana plasmática, externalización de fosfatidilserina (FS), así como la condensación y fragmentación de cromatina.[7] Una característica distintiva de este proceso es la activación de un sistema de endonucleasas endógenas, la cual genera numerosos fragmentos en las bandas de ADN dentro de la cromatina.[8,9]

Hasta nuestro conocimiento éste es uno de los primeros trabajos en donde se reporta el estudio de los potenciales mitocondriales como indicadores de muerte celular. Por los resultados obtenidos a través del presente estudio podemos observar que en dos fracciones espermáticas (con alta y baja movilidad) muestran variaciones importantes en cuanto a cambios de membrana plasmática (anexina-V) y el efecto en los potenciales de membrana a nivel mitocondrial. Deberán ser llevados a cabo estudios prospectivos para determinar el efecto final y su relación con los procesos de fertilidad en el hombre. ■

Referencias bibliográficas

1. Liu X, Kim C, Yang J. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirements for dATP and cytochrome c. Cell 1996; 86: 147-57.
2. Arends M, Wyllie A. Apoptosis-the role of the endonuclease. Am J Patol 1990; 136: 593-608.
3. Green D, Reed J. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-12.
4. Liu D, Gordon B U. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding and fertilization rates in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 1178-84.
5. Aitken R, Irvine D, Wu F. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991; 13: 433-51.
6. Hofmann N, Hilseher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. Hum Reprod 1991; 6: 979-82.
7. Earnshaw W. Nuclear chances in apoptosis. Curr Opin Cell Biol 1995; 7: 337-45.
8. Compton M. A biochemical Hallmark of apoptosis-internucleosomal degradation of the genoma. Cancer Metast Rev 1992; 11: 105-19.
9. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Deoxyribonucleic acid fragmentation and plasma membrane translocation of phosphatydilserine in human spermatozoa: relationship with the generation of reactive oxygen species. Hum Reprod 2000; 15: 1338-44.

GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

Caracterización bioquímica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1-β como mediador de degradación de tejido conectivo en membranas corioamnióticas humanas en cultivo

■ Guadalupe del Carmen Estrada Gutiérrez,[1] Felipe Vadillo-Ortega,[1] Marco A. Jiménez González,[2] Jorge Beltrán Montoya,[3] Silvia Giono Cerezo[4]

■ **RESUMEN**

Objetivo. Caracterizar el efecto de la IL-1-β sobre el metabolismo de tejido conectivo de la membrana corioamniótica humana en cultivo (MCA). ***Tipo de estudio.*** Experimental con modelo *in vitro*. ***Material y método.*** Se utilizaron explantes de MCA obtenidas de cesáreas y se mantvieron en cultivo. Se descartó la presencia de infección local mediante microbiología. Se realizó ensayo de viabilidad de los explantes con XTT. Se estimuló a los explantes con diferentes dosis de IL-1-β en un rango de 0 a 10 ng/mL. Después de la estimulación se cuantificaron proteínas, producción de MMP-9 por zimografía y cada explante se dividió en dos partes: una se utilizó para cuantificación de colágena y otra parte se analizó en microscopia electrónica. ***Resultados.*** Las MCA permanecieron con adecuada viabilidad y funcionalidad. La estimulación con IL-1-β resultó en la expresión de cantidades crecientes de MMP-9, de acuerdo al método de zimografía y el efecto fue máximo a las 36 horas posteriores a la estimulación. El contenido de colágena disminuyó de manera progresiva después de la estimulación con la IL-1-β y alcanzó un mínimo a las 36 horas. El aspecto de las fibras de colágena se desordenó de manera progresiva y al cabo de 36 horas ya no era posible observar el patrón de fibras característico de esta proteína. ***Conclusiones.*** La información presentada permite concluir que la IL-1-β es capaz de inducir la expresión de enzimas con efecto sobre el tejido conectivo y con ello se confirma su participación en el proceso de ruptura de las membranas bajo condiciones de inflamación.

Palabras clave: Interleucina 1-β, tejido conectivo, membranas corioamnióticas, cultivo.

(Estrada Gutiérrez G. *et al.* Caracterización bioquímica y ultraestructural del efecto de la interleucina 1-β como mediador de degradación de tejido conectivo en membranas corioamnióticas humanas en cultivo. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 190).

■ **ABSTRACT**

Objective. *To characterize the effect of IL-1β, on connective tissue metabolism in a human chorioamnionic membrane tissue culture (CAM).* ***Type of study.*** *Experimental, in an in vitro model.* ***Material and methods.*** *CAM explants obtained from cesarean sections were cultured. The presence of local infection was excluded by microbiological methods. An XTT viability essay of the explants was carried out. Explants were stimulated with different doses of IL-1β within a 0-10 ng/mL range. After the stimulation, protein content was measured, MMP-9 production was determined by zymography, and each explant was divided in two parts: one was used for collagen measurement and the other analyzed by electronic microscopy.* ***Results.*** *CAMs kept adequate viability and funcionality. IL-1β stimulation produced an increase in the amount of MMP-9 expressed, as determined by the zymography method with a maximum effect 36 hours after stimu-*

[1]Dirección de Investigación, [2]Departamento de Microscopia Electrónica, [3]Subdirección de Ginecología y Obstetricia, Instituto Nacional de Perinatología y [4]Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.

lation. Collagen content decreased in a progressive manner after IL-1β stimulation and reached its minimum after 36 hours. The characteristic pattern of collagen fibers gradually lost its organization, and could not be observed any more after 36 hours. ***Conclusions.*** *The information presented here allows us to conlude that IL-1β is capable of inducing an enzymatic expression affecting connective tissue, thus confirming its participation in membrane degradation processes under inflammatory conditions.*

Key words: Interleukine 1β, connective tissue, chorio-amnionic membrane, culture

(Estrada Gutiérrez G. *et al.* Biochemical and ultrastructural characterization of the interleukine-1β effect as a mediator of connective tissue degradation in human chorio-amnionic membrane tissue culture. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 190).

■ INTRODUCCIÓN

Las membranas que delimitan la cavidad amniótica tienen como funciones actuar como barrera mecánica y secretar diferentes sustancias con efectos locales. Estas membranas están formadas de dos capas adheridas llamadas amnios y corion, que a su vez están compuestas de distintos tipos de células embebidas en una matriz de colágena.[1]

La ruptura de las membranas corioamnióticas es un proceso fisiológico que normalmente ocurre durante el trabajo de parto, pero hasta en 15% de todos los embarazos, se rompen antes de que éste se inicie, patología que se denomina ruptura prematura de membranas (RPM).[2] El mecanismo molecular que desencadena la ruptura de membranas, ya sea en condiciones normales o patológicas, no está bien establecido y se atribuía sólo a factores mecánicos y traumáticos como las contracciones repetidas durante el trabajo de parto. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que el fenómeno es mucho más complejo e involucra diversos procesos bioquímicos. La identificación de estos procesos en el mecanismo de ruptura, ha permitido proponer que las membranas fetales y la decidua pueden responder a estímulos bioquímicos, mecánicos y a la infección del tracto genital materno, produciendo mediadores como prostaglandinas, citocinas[3] y algunas hormonas proteicas que regulan la actividad de las enzimas que degradan la matriz extracelular de las membranas.[4] El mantenimiento de la fuerza tensil de las membranas fetales, depende del equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular, por lo que la disminución en el contenido de colágena,[5] la alteración de su estructura y el incremento en la actividad colagenolítica, están asociadas a ruptura, ya sea normal o en forma prematura.[6] La degradación de la matriz extracelular está controlada por la acción de una familia de enzimas dependientes de zinc llamadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) y sus inhibidores (TIMP).[7]

En diversos estudios se ha demostrado que además del incremento de MMP, también hay aumento local de algunos mediadores de inflamación como las citocinas IL-1β y TNF-α,[8] así como de prostaglandinas en casos con y sin infección, por lo que la ruptura de membranas se podría considerar como un evento de tipo inflamatorio, en el que todos los mediadores establecen interconexiones: el aumento de citocinas proinflamatorias, incrementa la producción de metaloproteasas de matriz extracelular y prostaglandinas, que a su vez tienen la capacidad de inducir contracciones de músculo liso uterino.[9]

Con estudios de inmunohistoquímica del estroma cervicouterino, placenta y membranas corioamnióticas en distintas etapas del embarazo, se ha visto que el número de macrófagos aumenta hasta 10 veces su número en embarazos a término en comparación con las etapas tempranas del embarazo.[10] En los casos con infección a nivel de placenta y membranas corioamnióticas, la inflamación está mediada por los neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos que son reclutados al sitio de la infección. La producción de IL-1β y TNF-α incrementa la síntesis de prostaglandinas y los niveles de transcripción de algunas MMP en el corion. El estiramiento repetido que se provoca con las múltiples contracciones, aunado a la sobreproducción de MMP, pueden debilitar progresivamente estas estructuras y predisponer la ruptura. Muchos comensales y patógenos de la flora cervicovaginal, pueden producir proteasas que disminuyen de manera significativa la fuerza tensil de las membranas, ocasionando una baja en la concentración tisular de colágena, específicamente la de tipo III; también se sabe que la elastasa de leucocitos polimorfonucleares humanos se une de manera específi-

ca a ésta, lo que sugiere que la infiltración leucocitaria a las membranas fetales debida a la colonización bacteriana o a la infección, puede disminuir la colágena de tipo III y como consecuencia inducir la ruptura de membranas.[11]

■ MATERIAL Y MÉTODO

Cultivo *in vitro* de membranas corioamnióticas. Se tomaron membranas corioamnióticas de mujeres con embarazo normal a término sin ninguna patología, que se resolvió por cesárea en ausencia de trabajo de parto, sin evidencia clínica y microbiológica de infección. En la sala de expulsión e inmediatamente después de ser extraída la placenta, se tomó una muestra para análisis microbiológico con un hisopo de dracrón. Se inoculó un caldo urea/arginina para el aislamiento de micoplasmas urogenitales (Biomerioux) y se colocó el hisopo en medio de Stuart (Deltalab) para su transporte al laboratorio. Después del procedimiento microbiológico, se cortaron las membranas fetales y fueron transportadas al laboratorio en medio DMEM (GIBCO-BRL) con antibiótico-antimicótico a 1%. Las membranas se lavaron con solución salina fisiológica hasta eliminar los restos de sangre y fluidos, bajo condiciones de esterilidad. Con ayuda de un sacabocados, se cortaron explantes de 1 cm de diámetro y se colocaron en placas de 24 pozos con 1 mL de DMEM suplementado con suero fetal bovino (10%), piruvato de sodio (1%) y antibiótico-antimicótico (1%) (GIBCO-BRL). (DMEM-SFB).

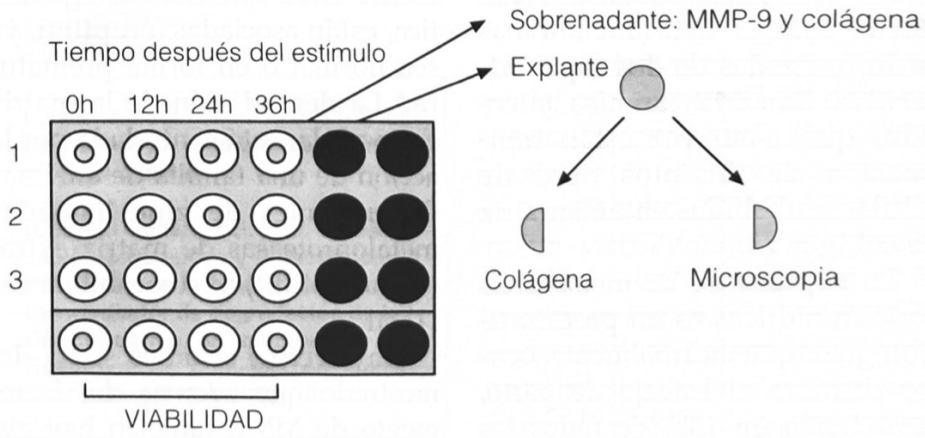
Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 (5%) durante 24 horas, al cabo de las cuales se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1 mL de medio fresco y se incubaron 24 h adicionales, luego de lo cual se cambió el medio por 1 mL de DMEM suplementado con lactoalbúmina (166.5 g/L), piruvato de sodio (1%) y antibiótico-antimicótico (1%) (DMEM-LAH) y se incubó durante 24 horas, al cabo de las cuales se volvió a agregar 1 mL de DMEM-LAH fresco y se procedió a la estimulación.

Prueba de viabilidad de las membranas fetales. Se realizó un ensayo de viabilidad con el reactivo Cell Proliferation Kit II (Boehringer Mannheim) para controlar la viabilidad de los explantes. El ensayo es colorimétrico y se basa en que las células viables metabolizan la sal de tetrazolio XTT dando como resultado una sal de formazan colorida que es soluble en agua. La intensidad de color de los sobrenadantes varía de acuerdo con el número de células viables en el explante.

Estimulación de las membranas con IL-1β. Se estimuló en triplicados a los explantes con diferentes dosis de IL-1β en un rango de 0 a 10 ng/mL. Dado que el efecto máximo se logró con 1.0 ng/mL, todos los experimentos posteriores se realizaron con esta concentración de la interleucina. Al cabo de 24 horas se aspiró el sobrenadante, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford y la producción de MMP-9 se cuantificó por zimografía.[12,13] Cada explante se dividió en dos partes: una se utilizó para cuantificación de colágena por determinación colorimétrica de hidroxiprolina y la otra parte se colocó en 1 mL de glutaraldehído a 2.5% en amortiguador de fosfatos pH 7.2, para observar la distribución de las fibras de colágena por microscopia electrónica (Figura 1).

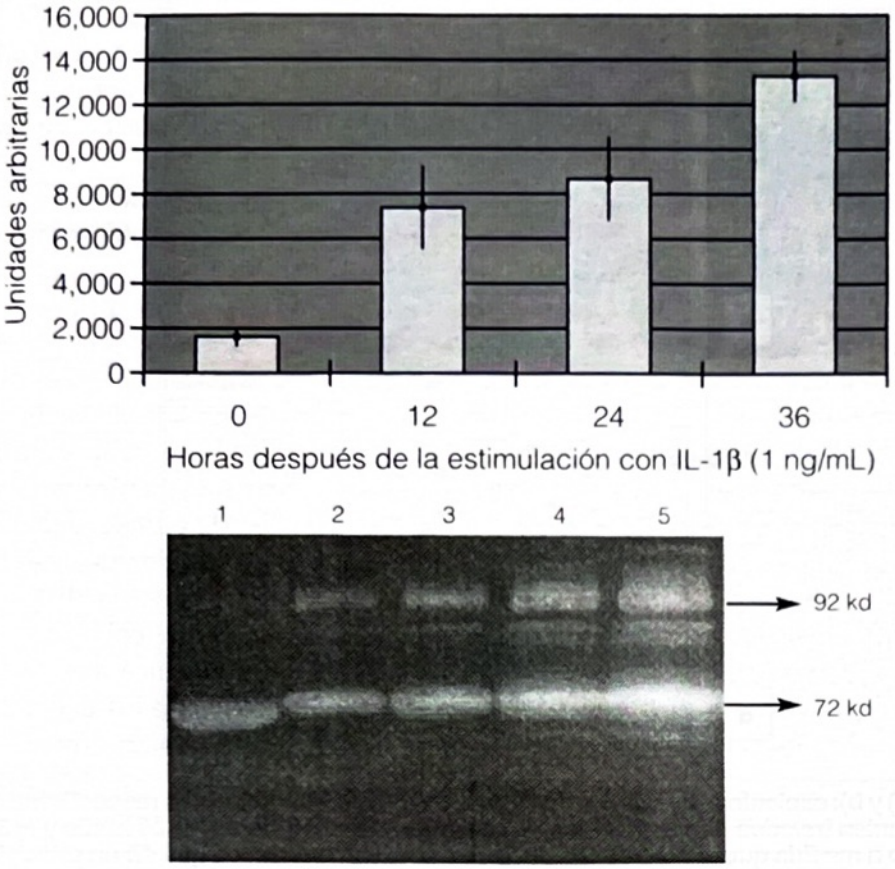
Procesamiento de los explantes para microscopia electrónica. El tejido se fijó en glutaraldehído y fue sometido a posfijación con tetraóxido de osmio disuelto en el mismo amortiguador, por 90 minutos. Para la inclusión, el tejido se colo-

Figura 1



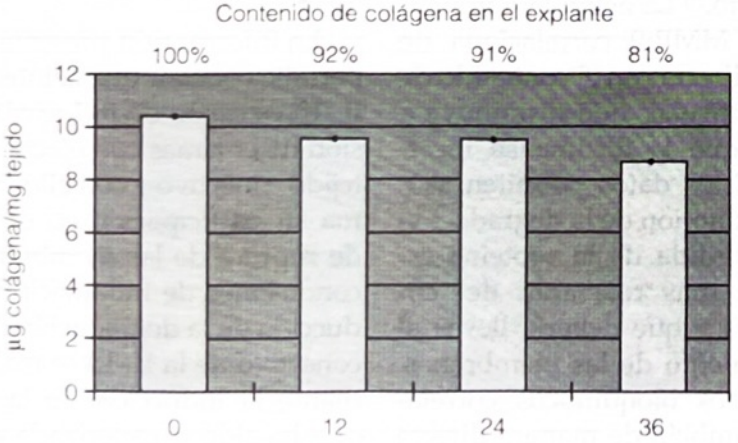
Diseño del experimento de estímulo de explantes con IL-1β (1 ng/mL) a diferentes tiempos.

Figura 2



Zimografía y análisis densitométrico de los sobrenadantes de cultivos de membranas corioamnióticas después de ser estimulados con 1 ng/mL de IL-1β por 0, 12, 24 y 36 horas respectivamente. Las bandas de lisis tienen un peso de 92 kd que corresponde a la MMP-9 inactiva.

Figura 3



Cuantificación de colágena en los explantes después de ser estimulados con 1 ng/mL de IL-1β por 0, 12, 24 y 36 horas.

ca en resina, se etiqueta y se incuba en una estufa a 60°C para su polimerización, durante 24 horas. De los bloques que se obtienen, se expone la superficie del tejido y se hacen cortes de 0.5 a 1 micra, se tiñen con azul de toluidina y se observan al microscopio óptico para buscar las zonas que se quiera estudiar. Una vez identificadas estas zonas, se hace un retallado del bloque y se deja sólo la parte de interés, realizando cortes ultrafinos (60-150 nm), los cuales se ponen en rejillas de cobre, se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo.

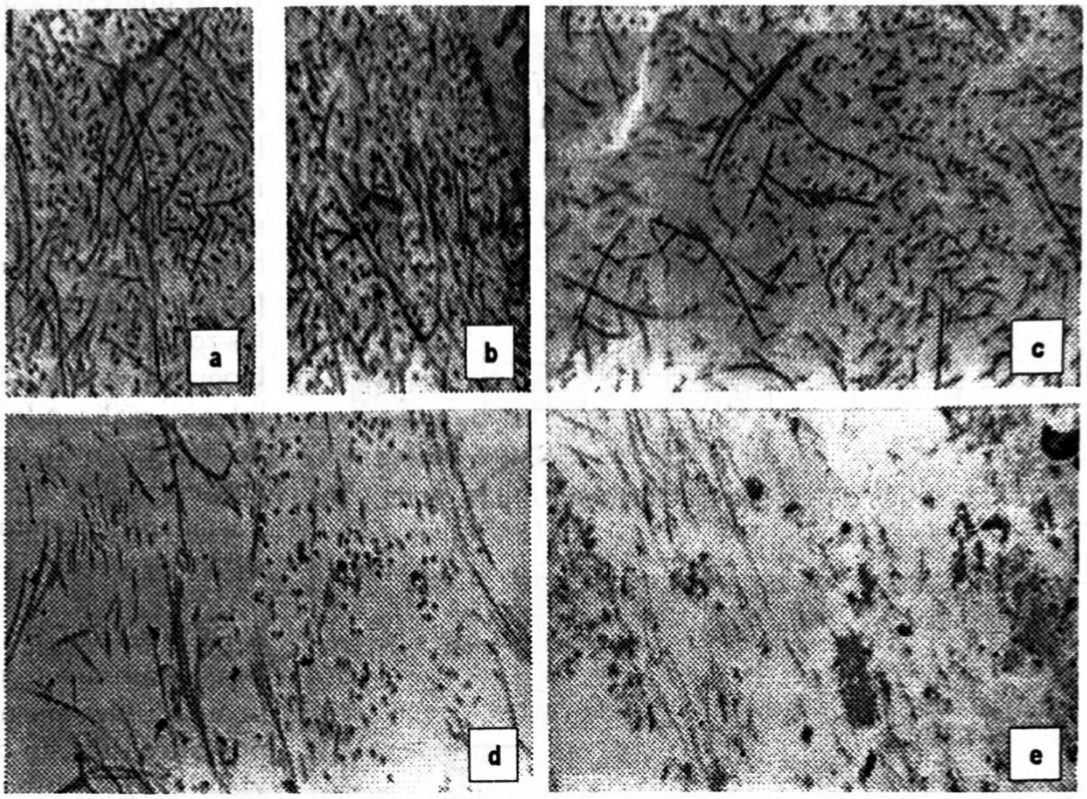
■ RESULTADOS

Las membranas corioamnióticas se mantuvieron en cultivo hasta por cinco días sin deterioro de su viabilidad y funcionalidad, de acuerdo con los ensayos de XTT y secreción de gelatinasas. La estimulación con IL-1β resultó en la expresión de cantidades crecientes de MMP-9, de acuerdo con el método de zimografía y el efecto fue máximo a las 36 horas posteriores a la estimulación (Figura 2). El contenido de colágena disminuyó de manera progresiva después de la estimulación con la interleucina IL-1β y alcanzó un máximo de 20% menor al contenido original a las 36 horas (Figura 3). El aspecto de las fibras de colágena se desordenó de manera progresiva y al cabo de 36 horas ya no era posible observar el patrón de fibras característico de esta proteína depositada en la matriz extracelular (Figura 4).

■ DISCUSIÓN

La interleucina IL-1β es una citocina de primera oleada en la respuesta inflamatoria y se ha señala-

Figura 4



Micrografía de la capa compacta del amnios: a) y b): explantes sin estimular a tiempo 0 y después de 36 horas respectivamente. Las figuras restantes representan los explantes tratados con IL-1β (1 ng/mL) después de: c) 12 horas, d) 24 horas y e) 36 horas de incubación. Se puede observar cómo a medida que avanza el tiempo, la red de bandas fibrosas que en un principio es homogénea, se va tornando laxa y las fibras se van separando y desapareciendo (20,000 aumentos).

do como uno de los mediadores potenciales del proceso de parto pretérmino, dados sus efectos sobre la musculatura lisa,[14] pero también como un factible mediador de la degradación de las membranas corioamnióticas, dado que en otras estirpes celulares induce la expresión de colagenasa intersticial.[15] El modelo de explantes de membranas corioamnióticas, resultó adecuado para la evaluación del efecto de la IL-1β, dado que conserva sus capacidades funcionales hasta por cinco días. A mayor tiempo de exposición de los explantes con IL-1β se producen cantidades crecientes de MMP-9, aunque llama la atención que la única forma detectable de la enzima es la correspondiente a la proforma de la MMP-9. La MMP-9 es sintetizada por poblaciones locales del corioamnios y se sabe que es inducida de manera selectiva hacia el momento del trabajo de parto.[16] La actividad aumentada de MMP-9 correlaciona de manera directa con el contenido de colágena tisular, que disminuye a medida que la enzima se incrementa. Estos datos permiten asociar la inducción de la degradación con la pérdida de la proteína estructural más relevante del corioamnios y que debería llevar al debilitamiento de las membranas. Estos datos bioquímicos correlacionan también de manera directa con los hallazgos ultraestructurales, que muestran la desorganización de las fibras de colágena que acompaña a los otros dos eventos señalados arriba y que a la luz de los datos bioquímicos reflejan la degradación de la matriz extracelular.

La información presentada aquí permite concluir que la interleucina IL-1β es capaz de inducir la expresión de enzimas con efecto sobre el tejido conectivo y con ello se confirma su participación en el proceso de ruptura de las membranas bajo condiciones de inflamación. La inducción de la degradación de tejido conectivo de la IL-1β se realiza mediante la inducción de la enzima que ha sido caracterizada como la más relevante para el proceso de ruptura de las membranas. ■

Referencias bibliográficas

1. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. N Engl J Med 1998; 338: 663-70.
2. Manual de Normas y Procedimientos de Obstetricia y Ginecología. Subdirección General Médica, Instituto Nacional de Perinatología-SSA, México, D.F. 1990.
3. Menon R, Swan KF, Lyden TW, Rote NS, Fortunato SJ. Expression of inflammatory cytokines (interleukin-1β and interleukin-6) in amniochorionic membranes. Am J Obstet Gynecol 1995; 172: 493-500.
4. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. J Reprod Fertil 1996; 89-96.
5. Vadillo OF, et al. Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. Obstet Gynecol 1990; 75: 84-8.
6. Malak TM, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture. Br J Obstet Gynaecol 1994; 101: 375-86.
7. Matrisian L. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet 1990; 6: 131-5.
8. Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. Cytokine networking in the placenta. Placenta 1993; 14: 249-75.
9. Opson SL, Wathen NC, et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 397-404.
10. Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, et al. Morphological and histochemical evidence for the occurence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilatation. Am J Obstet Gynecol 1980; 138: 273-81.
11. McGregor JA, French JI, Lawellin DW, et al. In vitro study of bacterial protease-induced reduction of chorioamnionitis membrane strength and elasticity. Obstet Gynecol 1987; 69: 167.
12. Vadillo OF, Gonzalez AG, Furth EE, et al. 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniocorion increases with labor. Am J Pathol 1995; 146: 148-56.
13. Vadillo OF, Hernández A, Gonzalez AG, Bermejo L, Iwata K, Strauss JF. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. Am J Obstet Gynecol 1996; 174: 1371-6.
14. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. J Reprod Fertil 1996; 89-96.
15. Lei H, et al. A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. J Clin Invest 1996; 98: 1971-8.
16. Rajabi M, Dean D, Beydoun S, Woessner F. Elevated tissue leveis of collagenase during dilatation of uterine cervix in human parturition. Am J Obstet Gynecol 1988; 159: 971-6.

Ginecología y Obstetricia de México

Competitividad óvulo-embionaria determinada a través de la cuantificación de los índices perifoliculares en la microarquitectura vascular por Doppler

■ Dr. Alberto Kably Ambe,[1] Dr. José Antonio Pérez Mendizábal,[2] Dra. Alejandra Sánchez De León,[1] Dr. Samuel Karchmer Kriviztky,[1] Dr. Gerardo Barroso Villa[1]

■ **RESUMEN**

Objetivo. Correlacionar en forma lineal los índices de flujometría Doppler con el desarrollo folicular y su consiguiente desarrollo embrionario en ciclos de hiperestimulación ovárica en los resultados de FIVTE/ICSI. ***Material y método.*** Se realizó un estudio prospectivo y observacional en donde se incluyó un total de 29 pacientes, a las cuales se les realizó determinación de la reserva ovárica por las condiciones morfométricas del ovario y la determinación basal de FSH. La cual fue correlacionada con los índices de pulsatilidad (IP), índice de resistencia (IR), relación sístole/diástole (S/D) y la velocidad de flujo máximo (TAMAX), por medio de USG de pulso-color Doppler. Todo esto correlacionado con el desarrollo embrionario. Análisis de covarianza, líneas de regresión e intervalos de confianza fueron aplicados para su determinación estadística. ***Resultados.*** La correlación entre los IR y la obtención de folículos maduros ($p = 0.05$), fue observada; al mismo tiempo se encontró una relación negativa de FSH con volumen ovárico. ***Conclusiones.*** Se han descrito una serie de marcadores de reserva ovular, si embargo, ninguno de ellos es específico cuando la calidad ovular es expresada por medio de la aplicación de inductores de la ovulación. Por los resultados obtenidos a través del presente estudio, podemos expresar que los índices de flujometría por Doppler, pueden ser indicadores de la expresión folicular y su consecuente desarrollo ovular y embrionario.

Palabras clave: óvulo, embrión, índices perifoliculares, microarquitectura vascular, Doppler.

(Kably Ambe A. *et al.* Competitividad óvulo-embionaria determinada a través de la cuantificación de los índices perifoliculares en la microarquitectura vascular por Doppler. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 196).

■ **ABSTRACT**

Objective. *To obtain the linear correlation between Doppler fluxometry rates and follicular development and the observed embryonary growth in ovarian hyperstimulation cycles in the IVFTE/ICSI results.* ***Material and methods.*** *A prospective and observational study including 29 patients was carried out. The ovarian reserve was determined —by the ovaries morphometric conditions— as well as basal FSH. These were correlated with pulsatility rates (PR), resistance rates (RR), and the systole/diastole ratio (S/D) and the maximum flow rate (TAmax), using a USG pulse-colour Doppler. All these were correlated to embryonary development. Covariance, regression lines and confidence intervals analyses were performed for its statistical determination.* ***Results.*** *A correlation between RR and the formation of mature follicles was observed ($p = 0.05$), and, at the same time, a negative relationship between FSH and*

[1]Unidad de Reproducción Asistida, Centro Especializado para la Atención de la Mujer, Hospital Ángeles de las Lomas. Edo. de México.

ovarian volume was found. ***Conclusions.*** *A series of markers of ovarian reserve have been described, however, none of these is a specific marker when ovum quality is expressed through the administration of ovulation inducers. Considering the data obtained in our study, we can say that Doppler fluxometry rates can indicate follicular expression and the resulting ovum and embryo development.*

Key words: ovum, embryo, perifollicular rates, vascular microarchitecture, Doppler

(Kably Ambe A. *et al.* Ovum-embryo competitivity determined by the Doppler quantification of perifollicular rates in vascular microarchitecture. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 196).

La transferencia de preembriones de alta calidad a la cavidad uterina se considera como uno de los objetivos finales en fertilización *in vitro*, lo que provee a parejas que cursan con infertilidad mayores posibilidades de concepción. Se han llevado a cabo investigaciones en forma extensa para la identificación de biomarcadores que expresen la viabilidad embrionaria y su consiguiente implantación, a fin de permitir una selección más adecuada de estos embriones, los cuales posean una mayor competencia en su desarrollo para ser transferidos en forma posterior o, en su caso, ser criopreservados.[1]

La foliculogénesis ovárica está determinada por cambios endocrino-paracrino, que requieren de la interacción dinámica entre la maduración ovular, la suplementación de las células de la granulosa y la presencia de ciertos factores en el líquido folicular. El inicio del crecimiento folicular involucra cambios tanto fisiológicos, como genéticos y metabólicos para completar en forma adecuada el proceso de meiosis, la prevención de polispermia y el proceso inicial de embriogénesis después de la fertilización.

Tanto la adecuada cantidad como la calidad ovular son necesarios en fertilización *in vitro*. El número de folículos en desarrollo que han sido reclutados dependen en forma proporcional a la reserva ovárica, relacionada con la edad cronológica de la mujer, concentraciones basales séricas de FSH, LH, E_2 e inhibina B, así como las determinantes de volumen ovárico. La calidad ovárica por otro lado, es una consecuencia directa de los procesos metabólicos y sincronización cromosómica que permitan un status de fertilización adecuada y el inherente control genético, para el adecuado desarrollo embrionario en forma temprana así como su diferenciación. Cada uno de estos procesos se encuentran relacionados en forma intrínseca con los fenómenos de atresia e inhibición en los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis.

Cada embrión posee un potencial de desarrollo único y sólo una pequeña y relativa proporción de ellos en el momento de la división celular, es competente para la implantación después del proceso de fertilización en condiciones *in vitro* y su desarrollo a través de la gestación.[2,3] Defectos letales en el desarrollo ocurren en el gameto femenino antes de la inseminación. Es del conocimiento que los óvulos maduros pueden contener alteraciones cromosómicas de tipo numérico (aneuploidismo) y defectos estructurales a nivel citoplasmático que *predisponen* de cierta manera la fertilización ovular y la subsiguiente falla en el desarrollo embrionario.[3,4] El potencial de implantación embrionaria puede ser correlacionado con el grado y *status* de división; sin embargo, el valor predictivo en forma general es relativamente bajo. El grado de fragmentación embrionaria u otros defectos morfológicos, así como el retardo en el desarrollo, pueden indicar en forma indirecta una incidencia mayor de anomalías cromosómicas.[5]

Todas estas anomalías pueden ser el resultado de alteraciones de las condiciones intrafoliculares durante la maduración ovular en ciclos de hiperestimulación ovárica controlada. La expresión en las formas de aneuploidismo en óvulos maduros es debido a defectos cromosómicos que se llevan a cabo antes de la supresión en el proceso final de meiosis en estadios de maduración en profase.[6] Claramente sabemos que condiciones no óptimas en los medios de cultivo, incluyendo medios de cultivo de baja calidad, pueden generar o ser aditivos para los defectos preexistentes. Se ha tratado de demostrar la presencia de ciertos factores a nivel intrafolicular que son secretados a la circulación general y que pudieran ser predictivos del desarrollo y la competencia óvulo-embrionaria.

Estudios relacionados con la disolución de oxígeno y la composición de factores de crecimiento vascular han sugerido una posible correlación entre las condiciones intrafoliculares y la calidad ovular. Estos estudios han mostrado

que folículos que contienen una cantidad disminuida de O_2 (< 1%) (clasificados como severamente hipóxicos) presentan de la misma manera una vascularidad disminuida.[6]

Por otro lado, el incremento en la angiogénesis perifolicular parece estar relacionada con factores de crecimiento producidos tanto por células de la teca como de la granulosa. Ciertas isoformas del factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) han sido estudiados, mostrando un incremento en su síntesis en respuesta a ciertas condiciones de hipoxia.[7] Se ha señalado una relación entre la expresión de FCVE, vascularización perifolicular y niveles de oxígeno intrafolicular.[8]

La aplicación del ultrasonido Doppler color para la determinación de las constantes de flujo sanguíneo han sido utilizados recientemente en el monitoreo del desarrollo folicular en ciclos de hiperestimulación ovárica. Esto ha permitido obtener información detallada acerca de las características folículo-específico de flujo sanguíneo, lo que ha provisto de un indicador de desarrollo en la vasculatura perifolicular. Diversos estudios en donde la vasculatura y el flujo sanguíneo perifolicular han sido examinados durante el proceso de hiperestimulación ovárica en ciclos de fertilización *in vitro* (FIVTE), han llegado a la conclusión que cada folículo al final de su desarrollo posee características de flujo vascular únicas con un desarrollo capilar perifolicular independiente.[8,9]

Dando seguimiento a estas líneas de investigación y con el objetivo de corroborar los índices de flujometría Doppler con el desarrollo folicular y su consiguiente desarrollo embrionario se diseñó un estudio prospectivo para el estudio de la competencia ovular y calidad embrionaria en ciclos de hipestimulación ovárica en reproducción asistida.

Un total de 29 pacientes fueron incluidas en forma prospectiva dentro del estudio, el cual fue realizado entre noviembre y diciembre del 2000. El rango de edad fue entre 21 y 35 años, los diagnósticos que se incluyeron fueron a) tuboperitoneal (n=21), o b) asociado a factor masculino (n=8) mostrando una oligoastenoteratozoospermia de moderada a severa, siempre y cuando la fracción de recuperación posterior a la prueba de capacitación *(swim-up)* fuera mayor de 1 x 10^6 espermatozoides. Aquellas pacientes con una FSH ≥ 15 mUI/mL por estudio de quimioluminiscencia (predictivo de pobre respuesta ovárica) fueron excluidas del análisis. En adición también se eliminó del estudio a pacientes con una relación LH/FSH de 0.85: 1 o mayor [ovario poliquístico (SOP)] y aquellas que cursaran con hipogonadismo hipogonadotrópico.

Para la determinación del volumen ovárico se utilizó la fórmula elipsoidal de alargamiento hacia los polos [V=D1xD2xD3x0.53], en donde D1, D2 y D3 corresponden a los diámetros longitudinal, anteroposterior y transverso máximos respectivamente.

Todos las pacientes fueron suprimidas con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH) (Reliser®: Laboratorios Serono de México, Ciudad de México), utilizando el protocolo de fase lútea media. La GnRH fue iniciada en la fase lútea media previo al ciclo estimulado a una dosis de 0.5 mg/día y reduciendo a 0.25 mg/día al iniciar el primer día del ciclo menstrual, el cual se continuaría hasta la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) —protocolo largo de aGnRH-FSH recombinante (Gonal-F®: Laboratorios Serono de México, Ciudad de México), se administró el día tres del ciclo menstrual con dos ámpulas (150 UL/ámpula), en donde la dosis sería ajustada en forma individual utilizando el protocolo de *step-down*. Cuando se observó un mínimo de tres folículos ≥ 18 mm a través del ultrasonido, se administraron 10,000 UI intramusculares de hCG. Los ciclos fueron cancelados cuando menos de tres folículos se reclutaron al día nueve del ciclo o si el pico de estradiol se incrementaba en forma inapropiada. La aspiración folicular se llevó a cabo 34 a 36 horas posteriores a la administración de hCG.

La evaluación del flujo vascular ovárico se llevó a cabo al inicio de la estimulación ovárica (tercer día del ciclo menstrual). Del mismo modo, se analizaron las características de flujo vascular perifolicular con la aplicación de ultrasonido de pulso color Doppler (Sequoia 512, Acuson, Mountain View, CA) en folículos asignados previamente por cada paciente. Se midió cada uno de los ovarios en sus ejes axial y longitudinal en tiempo real, con un transductor de 5-8 MHz. Los rangos de pulso por Doppler fueron tomados por cada uno de los vasos de interés, se realizó un análisis espectral de la velocidad y forma de onda emitida.

Se calcularon los siguientes índices de flujometría Doppler a través de este sistema ultrasonográfico: índice de pulsatilidad (IP) que

corresponde a la diferencial entre la sístole (S) y diástole (D) de la velocidad de pulso obtenido en un ciclo cardiaco [PI = (S-D)/medial; índice de resistencia (IR) determinado a través de una medida de ángulo independiente de pulsatilidad (IR = S-D/S); y relación S/D como índice de pulsatilidad en forma simplificada. La velocidad de flujo máximo ($TA_{máx}$) y el promedio del diámetro folicular fueron también evaluados. El mapeo folicular se realizó en forma longitudinal y transversa. La medición de los índices de flujo vascular fue realizada consistentemente por el mismo ultrasonografista.

Únicamente se analizó el resultado de oocitos preovulatorios maduros (metafase I y II durante el tiempo de aspiración). El proceso de inseminación dentro del laboratorio se llevó a cabo dependiendo de la indicación establecida por cada caso (estándar o a través de fertilización asistida con inyección intracitoplasmática de esperma o ICSI).

El desarrollo embrionario se llevó a cabo utilizando medios de cultivo (G1) hasta obtener de seis a ocho células previo a la transferencia embrionaria. Un promedio de cuatro embriones fueron transferidos a la cavidad uterina. Todas las pacientes recibieron suplemento de fase lútea con progesterona en aceite 200 mg I.M. diariamente).

■ ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de covarianza. Fue aplicado para correlacionar los índices de flujometría Doppler, fertilización y desarrollo embrionario. De la misma manera fueron analizados los parámetros de reserva ovárica. Líneas de regresión e intervalos de confianza fueron expresados ± 95%. Cada uno de los resultados se expresaron como el promedio ± su desviación estándar. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

■ RESULTADOS

Las características demográficas en el grupo de estudio son correlacionadas con los criterios de inclusión inicialmente mencionados para el diseño de estudio como se muestra en el cuadro I.

El número de folículos aspirados fue de 17.8 ± 7.9, en donde el número de óvulos maduros (metafase II) fue de 10.7 ± 5.3. la tasa de fertilización por ciclo fue de 74.2% con un porcentaje de segmentación embrionaria de 82% como se muestra en el cuadro II.

No se observaron diferencias en los índices de flujometría Doppler (IR, IP, relación S/D, y $TA_{máx}$) cuando se valoraron las características en la vasculatura por cada uno de los ovarios (Cuadro III).

Cuadro I

Parámetros de estimulación por grupos de estudio

Número de pacientes	29
Edad (años)	32.11 ± 4.8
Peso (kg)	61.9 ± 10.6
Talla (cm)	161.2 ± 0.07
Índice de masa corporal (IMC)	24.0 ± 4.1
FSH (mUI/mL)	7.06 ± 4.1
LH (mUI/mL)	4.76 ± 2.68
Estradiol (pg/mL)	54.3 ± 28.5
Volumen ovárico (cm^3)	7.23 ± 3.7
Pico de estradiol (pg/mL)	3,575.2 ± 2,775
Grosor endometrial (mm)	10.2 ± 2.0
Día de administración de hCG	13.5 ± 1.10
Número de ampolletas	26.7 ± 8.8

Cuadro II

Características generales en el desarrollo folículo-embrionario

Número de folículos aspirados	17.8 ± 7.9
Profase I (PI)	0.93 ± 1.0
Metafase I (MI)	1.65 ± 1.7
Metafase II (MII)	10.78 ± 5.3
Cigoto (2pN)	9.17 ± 4.9
Tasa de fertilización	74.2%
Tasa de segmentación	82.0%

Cuadro III

Índices de flujometría Doppler perifolicular

Variables	Ovario derecho	Ovario izquierdo
Índice de resistencia (IR)	0.59 ± 0.07	0.69 ± 0.38
Índice de pulsatilidad (IP)	0.84 ± 0.13	0.88 ± 0.20
Relación sístole/diástole (S/D)	2.53 ± 0.46	2.88 ± 1.22
Velocidad de flujo máximo ($TA_{máx}$)	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.03

El desarrollo embrionario fue valorado por cada una de las constantes estudiadas, correlacionando cada uno de los índices de flujo vascular perifolicular al final de la estimulación ovárica con los resultados finales obtenidos durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, también se correlacionaron las constantes de reserva ovárica (FSH y volumen ovárico) entre sí (Cuadro IV).

El número de folículos maduros (MII) al final de la estimulación ovárica fue correlacionado en forma negativa con el índice de resistencia perifolicular [(r=-0.49) (p=0.05) (como se muestra el la figura 1. La evaluación de la reserva ovárica muestra un efecto negativo cuando se correlacionan la FSH basal al tercer día del ciclo y las constantes volumétricas [(r=-0.47) (p=0.04) (Figura 2).

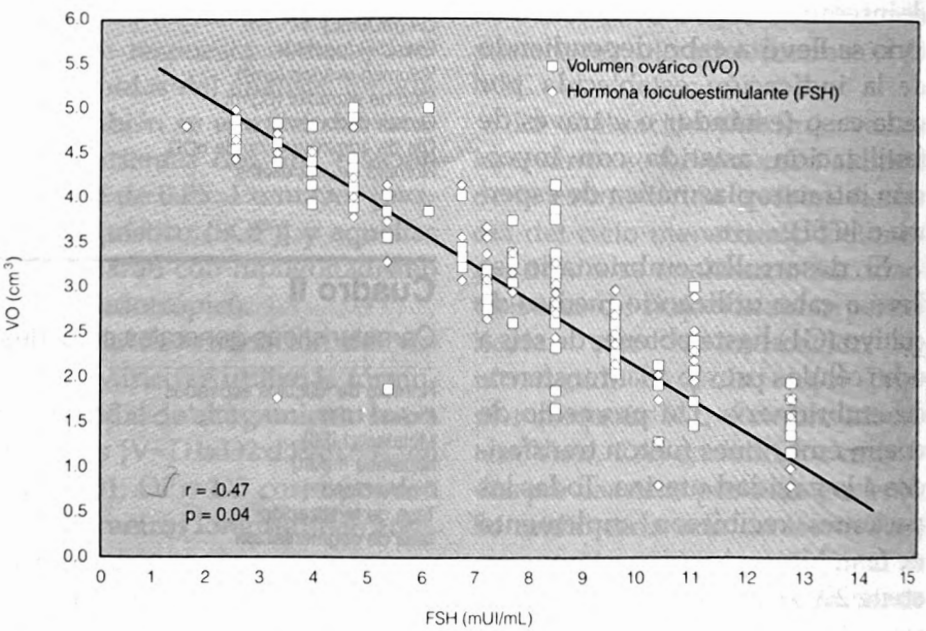
Cuadro IV

Correlación de los parámetros de flujometría perifolicular con el desarrollo embrionario

	r	r^2	Error estándar	t	p
MII *vs.* IR	-0.49	0.36	6.29	1.1	0.05*
MII *vs.* IP	0.07	0.06	9.57	0.35	0.72
MII *vs.* S/D	-0.02	0.005	1.98	-0.010	0.91
MII *vs.* $TA_{máx}$	0.05	0.002	6.3	0.23	0.81
2pN *vs.* IR	0.05	0.002	8.49	0.22	0.82
2pN *vs.* IP	0.11	0.01	5.62	0.51	0.61
2pN *vs.* S/D	-0.04	0.002	1.75	-0.21	0.83
2pN *vs.* $TA_{máx}$	-0.11	0.01	53.2	-0.48	0.63
Segmentación *vs.* IR	0.07	0.005	6.35	0.33	0.74
Segmentación *vs.* IP	0.20	0.04	3.90	0.88	0.38
Segmentación *vs.* S/D	-0.40	0.001	1.31	0.19	0.84
Segmentación *vs.* $TA_{máx}$	0.01	0.001	7.7	0.04	0.96
Volumen ovárico *vs.* FSH	-0.47	0.22	4.84	2.2	0.04*
Volumen ovárico *vs.* IR	0.25	0.06	5.83	1.06	0.29
Volumen ovárico *vs.* IP	0.19	0.03	1.21	0.83	0.41
Volumen ovárico *vs.* S/D	0.10	0.01	1.78	0.42	0.67
Volumen ovárico *vs.* $TA_{máx}$	-0.02	0.001	0.02	-0.08	0.93

*Diferencia significativa expresada como $p < 0.05$.

Figura 1



*Coeficientes de regresión expresados a + 95% de los intervalos de confianza para FSH y VO

Correlación negativa de reserva ovárica entre FSH y volumen ovárico

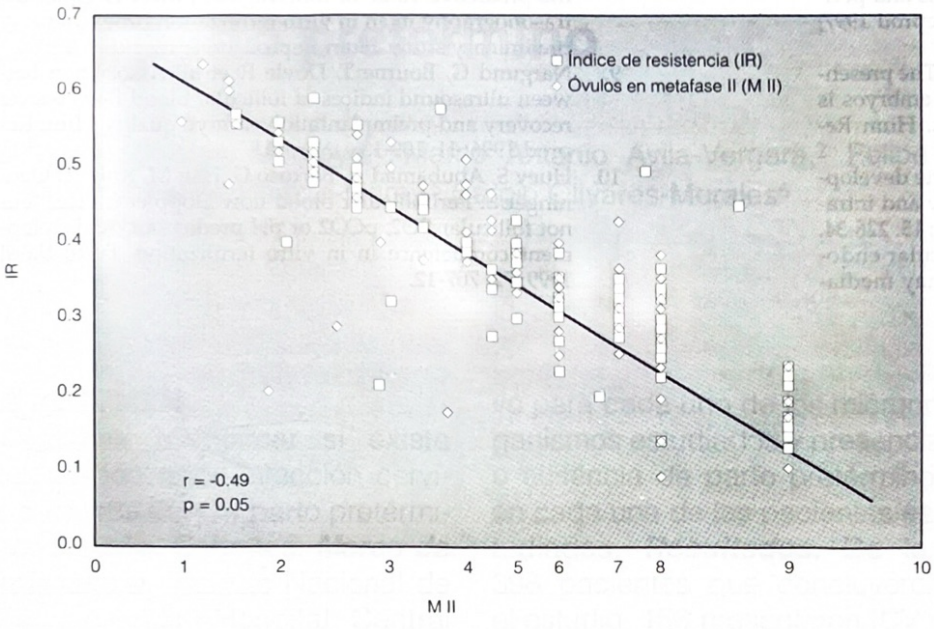
■ DICUSIÓN

Las condiciones de calidad folículo-ovular y desarrollo embrionario se hacen presentes a través del estudio prospectivo de las características de vascularidad ovárica y el subsecuente desarrollo en la microvasculatura perifolicular. Esto condiciona la formación de sustancias intrafoliculares (leptinas, interleucinas, FCVE, etc.) que interaccionan entre sí para la formación de óvulos de cierta calidad que será expresado posteriormente en el proceso de fertilización.

Las constantes de flujometría Doppler han sido correlacionadas no sólo con las características de fertilización, sino también con la presencia de defectos citoplasmáticos y distribución del huso cromosómico durante la división embrionaria cuando se asocia a una disminución en la microvasculatura perifolicular y bajas concentraciones del factor vascular endotelial en folículos con parámetros de hipoxia severa.[4]

Con el objetivo de correlacionar los parámetros de flujo en la microvasculatura perifolicular con el de-

Figura 2



*Coeficientes de regresión expresados a ± 95% de los intervalos de confianza para IR y M II

Regresión lineal entre los índices de resistencia vascular y la maduración ovular

sarrollo folicular y embrionario, los resultados mostrados a través del presente estudio, confirman la relación entre los parámetros de resistencia vascular y calidad embrionaria; esto explica que, aquellos folículos que muestran un estado hipóxico con un incremento en las resistencias vasculares darán origen a óvulos de baja calidad con una capacidad de fertilización pobre. Estos hallazgos han sido correlacionados en estudios anteriores en donde la concentración de pO_2 se encuentra en relación inversa con el incremento en los índices de impedancia.[10]

Por otro lado, la evaluación de reserva ovárica obtenida a través de la cuantificación de las concentraciones séricas de FSH y las condiciones morfométricas en cuanto a volumen ovárico, se expresan como marcadores confiables y predictivos a la respuesta con inductores de la ovulación.

Aunque resulta difícil demostrar una relación directa entre los índices metabólicos foliculares (pO_2, pCO_2 o pH) con la fertilización y la calidad embrionaria, la concentración de oxígeno parece ser un factor predisponente para la formación adecuada del huso ovular, la agregación cromosómica, maduración ovular y fertilización con el subsiguiente proceso de implantación.

En forma teórica la determinación de índices de flujometría vascular con la aplicación de Doppler en folículos individuales (folículo-específico) pudiera ser aplicada para la selección de óvulos con un potencial de implantación superior. Sin embargo, será necesario un número mayor de estudios en forma prospectiva para correlacionar estos fenómenos en la dinámica perifolicular y la microvasculatura los cuales permitirán determinar cambios en el ambiente ovular (hipoxia, acidosis o factores paracrino-autocrino) que afectan la fertilización y el subsecuente desarrollo embrionario.

En conclusión, el análisis de la vasculatura perifolicular con la aplicación de la ultrasonografía Doppler en ciclos de reproducción asistida, puede funcionar como un indicador indirecto en la calidad ovular. Por otro lado, estos métodos no invasivos proveerán criterios selectivos para la selección y transferencia de embriones con un potencial preimplantaclonal superior. ■

■ Referencias bibliográficas

1. Gradner D, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update 1997; 3: 367-82.
2. Acosta A, Oehninger S, Morshedi M, Swanson R, Scott R, Irianni F. Implantation potential of each preembryo in multiple pregnancies obtained by in vitro fertilization seems to be different. Fertil Steril 1988; 50: 906-11.
3. Van Blerkom J. Can the developmental competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory? Hum Reprod 1997; 12: 1610-4.

4. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. Hum Reprod 1997; 12: 1047-55.
5. Kligman I, Benavide C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. Hum Reprod 1996; 11: 1492-8.
6. Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. J Assist Reprod Genet 1998; 15: 226-34.
7. Shweiki D, Itin A, Soifer D, Keshet E. Vascular endotelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992; 359: 843-5.
8. Chui D, Pugh N, Walker S. et al. Follicular vascularity-the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in vitro fertilization programme. A preliminary study. Hum Reprod 1997; 12: 191-6.
9. Nargund G, Bourne T, Doyle P. et al. Association between ultrasound indices of follicular blood flow, oocyte recovery and preimplantation embryo quality. Hum Reprod 1996; 11: 109-13.
10. Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu M, Kolm P, Oehninger S. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular PO2, pCO2 or pH predict oocyte development competence in in vitro fertilization. Fertil Steril 1999; 72: 707-12.

GINECOLOGÍA
Y OBSTETRICIA
DE MÉXICO

Infección cervicovaginal como factor de riesgo para parto pretérmino

■ Jorge Beltrán Montoya,[1] Marco Antonio Avila-Vergara,[2] Felipe Vadillo-Ortega,[3] César Hernández-Guerrero,[4] Felipe Peraza-Garay,[5] Sergio Olivares-Morales[6]

■ **RESUMEN**

Objetivo. Identificar si existe asociación entre infección cervico-vaginal (ICV) y parto pretérmino. ***Diseño.*** Cohortes. ***Marco de referencia.*** Instituto Nacional de Perinatología, Hospital Central Militar y Hospital General Regional No. 1, IMSS, Culiacán, Sinaloa, México. ***Pacientes.*** 468 pacientes que acudieron a control prenatal y atención del parto. ***Intervenciones.*** Frotis en fresco, tinción de Gram y cultivo de muestras cervicovaginales obtenidas en las siguientes etapas de la gestación: primera muestra a las 16-24 semanas de gestación, segunda muestra a las 25-32 semanas y tercera muestra a las 33-42 semanas. Los microorganismos investigados fueron: Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Ureaplasma urealyticum, Streptococcus agalactiae, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Listeria monocytogenes y Chlamydia trachomatis. En el caso de cultivo positivo se indicó tratamiento específico. ***Mediciones.*** Cultivo positivo o negativo para cada uno de los microorganismos estudiados y presencia o ausencia de parto pretérmino, en cada una de las pacientes estudiadas. ***Resultados.*** De las 398 pacientes que concluyeron el estudio, 156 presentaron ICV y 242 no presentaron ICV; no hubo diferencias entre ambos grupos en la incidencia de parto pretérmino. Los riesgos relativos significativos fueron: en la primera etapa, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* con RR = 9.0 (6.81, 11.8); en la segunda etapa, *Ureaplasma urealyticum* con RR = 6.2 (3.30, 11.7) y *Escherichia coli* con RR = 3.4 (1.33, 8.6); en la tercera etapa *Ureaplasma urealyticum* con RR = 9.19 (6.93, 12.1). El análisis de regresión logística identificó en la segunda etapa a *Ureaplasma urealyticum* con OR = 16.6 (2.9, 93.7), estadísticamente significativo p = 0.001. El análisis de supervivencia mostró diferencias en ambos grupos respecto a la duración del embarazo (p < 0.001). ***Conclusiones.*** Existe diferencia en la duración del embarazo entre las pacientes con ICV y sin ICV. *Ureaplasma urealyticum* se asocia consistentemente con parto pretérmino.

Palabras clave: parto pretérmino, infección cervicovaginal, *Ureaplasma urealyticum*, factor de riesgo.

(Beltrán Montoya J. *et al.* Infección cervicovaginal como factor de riesgo para parto pretérmino. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 203).

■ **ABSTRACT**

Objective. *To identify the possible association between cervicovaginal infections (CVI) and preterm delivery.* ***Design.*** *Cohorts.* ***Reference frame.*** *Instituto Nacional de Perinatología, Hospital Central Militar and Hospital General Regional No. 1, IMSS, Culiacán, Sinaloa, México.* ***Patients.*** *Four hundred and sixty eight patients attending prenatal control and delivery care.* ***Interventions.*** *Fresh smears, Gram stain, and cervicovaginal sample culture from samples obtained during the following gestational stages: First*

[1]Subdirección de Ginecología y Obstetricia, Instituto Nacional de Perinatología; [2]Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital General Regional No.1, Culiacán, Sinaloa. Instituto Mexicano del Seguro Social. [3]Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Perinatología; [4]Departamento de Microscopia Electrónica, Instituto Nacional de Perinatología. [5]Escuela de Ciencias Físico-Matemáticas, Universidad Autónoma de Sinaloa. [6]Departamento de Ginecología y Obstetricia. Hospital Central Militar, México, D.F.

sample at 16-24 weeks, second sample at 25-32 weeks, and third sample at 33-42 weeks. The following microorganisms were studied: Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Ureaplasma urealyticum, Streptococcus agalactiae, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Listeria monocytogenes, *and* Chlamydia trachomatis. *In case of a positive culture, the specific treatment was indicated.* ***Measurements.*** *Positive or negative culture for each of the studied pathogens, and the presence or abscence of a preterm delivery for each of the patients included in the study.* ***Results.*** *Three hundred and ninety eight were still present at the end of the study, of which 156 had a CVI and 242 had no CVI. No differences between both groups were observed concerning preterm delivery. Significant relative risks were: In the first stage,* Ureaplasma urealyticum *and* Mycoplasma hominis *with RR = 9.0 (6.81, 11.8); in the second stage,* Ureaplasma urealyticum *with RR = 6.2 (3.30, 11.7) and* Escherichia coli *with RR = 3.4 (1.33, 8.6); in the third stage,* Ureaplasma urealyticum *with RR = 9.19 (6.93, 12.1). The logistic regression analysis identified* Ureaplasma urealyticum *during the second stage with OR = 16.6 (2.9, 93.7), statistically significant with p = 0.001. The survival analysis showed differences between the two groups concerning pregnancy duration (p < 0.001).* ***Conclusions.*** *There is a difference in the duration in pregnancy in patients with CVI and without CVI.* Ureaplasma urealyticum *is consistently associated with preterm delivery.*

Key words: preterm delivery, cervicovaginal infections, *Ureaplasma urealyticum*, risk factor.

(Beltrán Montoya J. *et al.* Cervicovaginal infections as a risk factor for preterm delivery. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 203).

■ INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud define el parto pretérmino como aquel que ocurre antes de las 37 semanas de gestación.[1] La incidencia de parto pretérmino, es de 8 a 9% de todos los embarazos.[2] El parto pretérmino contribuye en forma significativa a la morbimortalidad perinatal.[3] El nacimiento pretérmino es la causa más común de mortalidad y morbilidad perinatal, en los países desarrollados; las complicaciones de la prematurez producen más de 70% de las muertes fetales y neonatales anualmente en bebés sin malformaciones y contribuye en forma significativa a retardo en el desarrollo, alteraciones visuales y auditivas, enfermedad pulmonar crónica y parálisis cerebral. La morbilidad en los bebés prematuros que sobreviven incluye: síndrome de dificultad respiratoria (RDS), hemorragia intraventricular (IVH), displasia broncopulmonar (BPD), persistencia del conducto arterioso (PDA), enterocolitis necrosante (NEC), sepsis, apnea y retinopatía del prematuro (ROP). La morbilidad neurológica al largo tiempo incluye trastornos psicomotores.[4] Aunque el tratamiento del parto pretérmino ha recibido considerable atención, el promedio de partos pretérmino no ha declinado en los últimos 15 años.[5] Las drogas tocolíticas que inhiben el parto pretérmino son utilizadas frecuentemente en la práctica clínica, a pesar de su limitada evidencia de beneficio.[6]

Aunque los tocolíticos prolongan el embarazo, no han demostrado mejoría en el resultado perinatal o neonatal y tienen efectos adversos en las mujeres con parto pretérmino.[7] Entre las causas que contribuyen al parto pretérmino, se encuentran: la ruptura prematura de membranas (RPM), preeclampsia/eclampsia, *abruptio placentae*, embarazo múltiple, placenta previa, retraso del crecimiento intrauterino, polihidramnios, oligohidramnios, anormalidades fetales, amnioitis, insuficiencia del cuello uterino, problemas médicos maternos (diabetes, asma, abuso de drogas, pielonefritis). Las características maternas asociadas a parto pretérmino incluyen: raza, desnutrición, poca ganancia de peso durante el embarazo, antecedente de parto pretérmino previo, inadecuado o ausente control prenatal, trabajo extenuante, estrés personal, anemia, tabaquismo, bacteriuria, infección cervicovaginal (vaginosis bacteriana, *N. gonorrhoeae, Chlamydia, Mycoplasma* y *Ureaplasma*), anormalidad o daño cervical, malformaciones uterinas o miomas uterinos, actividad uterina excesiva con borramiento y dilatación cervical prematuramente.[8,9] Clínicamente el parto pretérmino puede dividirse en dos categorías: el que ocurre en forma espontánea (en 75% de los casos de los nacimientos pretérmino) después de trabajo de parto pretérmino, RPM, etc. Y el que ocurre en forma indicada (en 25% de los casos), indicado por desórdenes médicos u obstétricos que ponen en peligro la vida de la madre o el

feto. La distinción entre parto pretérmino espontáneo y parto pretérmino indicado es de utilidad por que nos permite un entendimiento del parto pretérmino como un síndrome el cual incluye: parto pretérmino, ruptura de membranas pretérmino (pRPM), amnioitis e insuficiencia ístmico-cervical. El parto pretérmino espontáneo es más frecuente entre mujeres de medio socioeconómico bajo, desnutridas, negras, y quienes tienen una historia de infección vaginal, en particular vaginosis bacteriana. En mujeres multíparas, el riesgo de parto pretérmino espontáneo está incrementado si tienen el antecedente de un parto pretérmino previo. La recurrencia del riesgo se incrementa conforme se incrementa el número de partos pretérmino previos, y se incrementa aún más conforme disminuye la edad gestacional de los partos pretérmino previos. Los factores de riesgo asociados con parto pretérmino tienen una prevalencia relativamente alta en la población general y consecuentemente un bajo valor predictivo en la detección del parto pretérmino espontáneo. Más de la mitad de éstos ocurre en mujeres que no tienen factores de riesgo obvios.[10] Se han propuesto múltiples sistemas de identificación del riesgo,[11] sin embargo, éstos tienen una sensibilidad no mayor de 50%.[12]

En los últimos años han sido revalorados todos los factores mencionados con mejores diseños de investigación clínica en diferentes etapas de la gestación. Así, el grupo colaborativo NICHD Maternal Fetal Medicine, informa que la presencia de vaginosis bacteriana, fibronectina fetal y acortamiento del cuello uterino son los factores predictores asociados consistentemente con el desenlace de parto pretérmino, y en pacientes multíparas el antecedente de parto pretérmino previo.[13]

Del trabajo de Goldenberg y col.[13] destaca la asociación ICV y parto pretérmino, y recientemente la observación de que la infección del tracto genital superior incrementa en forma significativa la producción de fibronectina fetal sobre todo en aquellas mujeres que tuvieron parto antes de las 32 semanas de gestacion.[14] Además, se ha observado que entre las pacientes con vaginosis bacteriana por *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* y la combinación de éstas (mixta) existe una mayor proporción que presenta sangrado uterino en el primer trimestre de la gestación (amenaza de aborto). El tratamiento de estas infecciones disminuye en forma significativa los riesgos de parto pretérmino entre las mujeres sin sangrado del primer trimestre.[15] Recientemente se ha reportado que la infección por *Ureaplasma urealyticum* se asocia con un incremento de parto pretérmino y resultados perinatales adversos.[16]

De los factores mencionados, la infección cervicovaginal es el factor susceptible de identificar oportunamente y de intervenir médicamente, por lo que en el presente trabajo se evalúa la fuerza de la asociación de estos microorganismos reportados como contribuyentes al parto pretérmino, en una cohorte de pacientes embarazadas de diferentes niveles de atención médica.

■ MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se llevó a cabo en tres hospitales: Instituto Nacional de Perinatología, Hospital Central Militar y Hospital General Regional No. 1 del IMSS, Culiacán, Sinaloa. Durante el periodo de marzo de 1994 a septiembre de 1999, previa autorización del Comité de Investigación y Ética, así como la aceptación de participación de las pacientes. Se estudiaron 468 pacientes que acudieron a control prenatal y atención del parto.

Criterios de inclusión

1. Embarazo mayor de 16 semanas confirmado por fecha de última menstruación y ultrasonido, control prenatal regular cada mes durante todo el embarazo hasta el momento del parto, tener por lo menos el resultado de tres muestras de cultivo cervicovaginal en las siguientes etapas de la gestación: a) primera muestra a las 16-24 semanas de gestación, b) segunda muestra a las 25-32 semanas, c) tercera muestra a las 33-42 semanas.
2. Atención del parto en sus unidades de adscripción.

Criterios de exclusión

Causas conocidas de parto pretérmino diferentes a infección cervicovaginal (insuficiencia ístmico-cervical, malformaciones uterinas o miomas uterinos, amniocentesis, embarazo múltiple, bacteriuria, complicaciones hemorrágicas durante el embarazo, preeclampsia/eclampsia, u otras causas de interrupción del embarazo de tipo médico, diabetes mellitus, oligohidramnios, etc.), y pacientes que no completaron las tres muestras o que no acudieron a consulta subsecuente o atención del parto.

Mediciones. Los microorganismos investigados en cada una de las muestras del cultivo cervicovaginal fueron: *Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Ureaplasma urealyticum, Streptococcus agalactiae, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Listeria monocytogenes* y *Chlamydia trachomatis*. También se realizó examen de frotis en fresco y tinción de Gram a cada una de las muestras.

A cada una de las pacientes se le registró la edad gestacional de acuerdo con su fecha de última menstruación y al momento del nacimiento por la valoración neonatal de Capurro y Lubchenco LO. (Lubchenco LO. Assessment of gestational age and development at birth. Ped Clin North Am 1970; 17: 125-145).

Intervenciones. Los resultados del cultivo se informaron al médico responsable del paciente para su tratamiento correspondiente. Sólo se dio tratamiento específico en los casos de infección.

Análisis estadístico. Las diferencias entre proporciones se analizaron por medio de las pruebas no paramétricas de χ^2 y prueba exacta de Fisher, según el caso. Las diferencias fueron consideradas significativas a un nivel de $p \leq 0.05$. El análisis univariado incluyó la estimación del riesgo relativo con sus respectivos intervalos de confianza de 95%. La duración de la edad gestacional fue evaluada por medio de tablas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier y la comparación entre grupos por medio de la prueba de Logrank. Para el caso del análisis multivariado se utilizó el modelo de regresión logística de Cox para establecer covariables favorables para parto pretérmino, las variables independientes (covariantes) analizadas fueron: *Candida albicans, Gardnerella vaginalis, Ureaplasma urealyticum, Streptococcus agalactiae, Mycoplasma hominis, Neisseria gonorrhoeae, Listeria monocytogenes* y *Chlamydia trachomatis*.

Los paquetes estadísticos utilizados fueron Epi Info 6, LogXact 2.1 y Statgraphics plus 7. El nivel de significancia para los datos estadísticos utilizados en todos los casos fue de 0.05.

■ RESULTADOS

Se estudiaron 468 pacientes, las cuales se dividieron en dos grupos de acuerdo con la evolución clínica del embarazo: Primer grupo de 178 pacientes que presentaron infección cervicovaginal (ICV) durante el embarazo y un segundo grupo de 290 pacientes que no presentaron ICV durante el embarazo. Del grupo de pacientes que presentaron infección, hubo 23 pérdidas o censuradas y del grupo de pacientes que no presentaron infección, hubo 47 pérdidas o censuradas.

En general, de las 398 pacientes que concluyeron el estudio, la incidencia de parto pretérmino fue de 11.5%.

Al comparar ambos grupos de pacientes. En el grupo de ICV de la incidencia de parto pretérmino fue 15.3% y en el de no ICV de 9.0%, el riesgo relativo RR = 1.69 (0.98, 2.91). Se observaron diferencias en la duración del embarazo, para el grupo de embarazadas con ICV fue de 38.3 ± 2.8 y las del grupo de no ICV de 39.1 ± 2.1, con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$), también se observó diferencia en cuanto a edad de las pacientes ($p < 0.0001$). La incidencia de RPM en el grupo de embarazadas con ICV fue de 11.6% y el grupo de no infectadas de 7.8%, el riesgo relativo de presentar RPM durante el embarazo en estas pacientes fue 1.49 (IC95% de 0.81a 2.74), sin diferencias estadísticas significativas. No se observaron diferencias en cuanto a paridad y vía de resolución del embarazo (Cuadro I).

La prevalencia de cada uno de los microorganismos en cada una de las etapas investigadas fue la siguiente:

Primera etapa del embarazo de 16 a 24 semanas de gestación. *Candida albicans* 19.3%, *Gardnerella vaginalis* 9.2%, *Ureaplasma urealyticum* 0.5%, *Streptococcus agalactiae* 1.2%, *Mycoplasma hominis* 0.5%, *Neisseria gonorrhoeae* 0%, *Listeria monocytogenes* 0%, *Chlamydia trachomatis* 0%, infección mixta (dos o más microorganismos simultáneamente) 2.7%; otros microorganismos 3.7% (enterococos, tres pacientes; *Escherichia coli*; *Proteus*, 1; *Klebsiella* 1; *Serratia* 1, *Trichomonas vaginalis*, 3). El riesgo relativo para cada uno de estos microorganismos no fue significativo estadísticamente; excepto para *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*, ambos con riego relativo de 9.0 (IC95% de 6.81 a 11.8), estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$). Fracción atribuible de 88.9% (IC95% de 85.3 a 91.6).

Segunda etapa del embarazo de 25 a 32 semanas de gestación. *Candida albicans* 10.5%, *Gardnerella vaginalis* 6.2%, *Ureaplasma urealyticum* 1.5%, *Streptococcus agalactiae* 0.75%, *Mycoplasma hominis* 0.2%, *Neisseria gonorrhoeae* 0%, *Listeria monocytogenes* 0%, *Chlamydia trachomatis* 0.5%, infección mixta (dos o más microorganismos simultáneamente), 2.7%; otros mi-

Cuadro I

Características generales de la población estudiada

Característica	Pacientes con ICV (n=156)	Pacientes sin ICV (n=242)	Valor p
Edad	24 ± 3.6	26 ± 2.6	p < 0.0001 *
Paridad			NS
Primigesta	59 (37.8%)	90 (37.1%)	
Secundigesta	34 (21.7%)	46 (19.0%)	
Multigesta	63 (40.3%)	106 (43.8%)	
Terminación del embarazo (semanas)	38.3 ± 2.8	39.1 ± 2.1	p < 0.0001*
Parto pretérmino	24 (15.3%)	22 (9.0%)	NS
RPM	18 (11.6%)	19 (7.8%)	NS
Pretérmino	6	6	
Término	12	13	
Resolución del embarazo			NS
Parto	126 (80.7%)	208 (85.9%)	
Cesárea	30 (19.2%)	34 (14.0%)	

ICV = Infección cervicovaginal, NS = No significativo
* Significativo estadísticamente

croorganismos, 2.0% (enterococos, 2 pacientes; *Escherichia coli* 5; *Proteus*, 1).

El riesgo relativo para cada uno de estos microorganismos no fue significativo estadísticamente, excepto para *Ureaplasma urealyticum* con riego relativo de 6.2 (IC95% de 3.30 a 11.7), estadísticamente significativo (p < 0.00l). Fracción atribuible 83.9% (IC95% de 69.7 a 91.5), y *Escherichia coli* con RR = 3.4 (1.33, 8.6) significancia estadística p ≤ 0.05. Fracción atribuible de 70.6% (IC95% de 24.9 a 88.5).

En cuanto a la asociación observada entre infección por *Ureaplasma urealyticum* y RPM en esta etapa del embarazo, cabe destacar que de los nueve casos de infección por *Ureaplasma urealyticum*, en un caso hubo además muerte fetal a las 28 semanas de gestación y en dos casos más, inmadurez fetal (uno sin presentar RPM). En cuatro casos se presentó el parto antes del término y en dos a término (uno sin presentar RPM).

Tercera etapa del embarazo de 33 a 42 semanas de gestación. *Candida albicans* 8.2%, *Gardnerella vaginalis* 4.2%, *Ureaplasma urealyticum* 0.7%, *Streptococcus agalactiae* 1.0%, *Mycoplasma hominis* 0.2%, *Neisseria gonorrhoeae* 0%, *Listeria monocytogenes* 0%, *Chlamydia trachomatis* 0%, infección mixta (dos o más microorganismos simultáneamente), 2.0%. Otros microorganismos, 0.5% (enterococos, 2 pacientes; *Escherichia coli*, 2).

El riesgo relativo para cada uno de estos microorganismos no fue significativo estadísticamente, excepto para *Ureaplasma urealyticum* con riego relativo de 9.19 (IC95% de 6.93 a 12.1), estadísticamente significativo (p ≤ 0.05). Fracción atribuible de 89.1% (IC95% de 85.6 a 91.8).

Por tanto, el análisis univariado encontró asociación entre ICV y parto pretérmino en las tres etapas del embarazo para *Ureaplasma urealyticum*, el cual fue estadísticamente significativo (p < 0.001). En la primera etapa *Mycoplasma hominis* con valor de p ≤ 0.05 y en la segunda etapa *Escherichia coli* con valor de p ≤ 0.05 (Cuadro II).

En el caso multivariado utilizando el modelo de regresión logística, solamente en la segunda etapa del embarazo resultó significativo *Ureaplasma urealyticum*, con una razón de momios de 16.6 (IC95% de 2.9 a 93.7), estadísticamente significativa, con un valor de p = 0.001 . Aunque no fueron significativos estadísticamente los otros microorganismos, en la primera etapa, la infección por *Candida albicans* presenta una razón de momios de 1.77 (IC95% de 0.88 a 3.55); en la primera y segunda etapa *Gardnerella vaginalis* presenta una razón de momios de 0.65 y en la tercera etapa de 0.46, no significativas (Cuadro III).

La comparación de las curvas de supervivencia de las pacientes con ICV (expuestas) y las pacientes sin ICV (no expuestas) en cuanto a la duración de la edad gestacional, se observa que el tiempo de supervivencia del grupo de no expuestos es mayor que las de expuestos. La comparación entre ambos grupos por medio de la prueba de Log-rank demuestra diferencias estadísticamente significativas (p = 0.00004).

■ DISCUSIÓN

Los bajos valores de predicción y la poca sensibilidad diagnóstica de los índices para detectar a las pacientes en mayor riesgo de riesgo de parto pretérmino, generan la necesidad de mejorar estas estrategias de identificación de

Cuadro II

Prevalencia de infección y riesgo relativo de parto pretérmino de acuerdo a microorganismo aislado, en diferentes etapas del embarazo de 398 pacientes

Característica o factor de riesgo	Etapa del embarazo 16 a 24 sem		25-32 sem		33 a 42 sem	
Infección por	**Prevalencia (%)**	**Riesgo relativo (IC 95%)**	**Prevalencia (%)**	**Riesgo relativo (IC 95%)**	**Prevalencia (%)**	**Riesgo relativo (IC 95%)**
Candida albicans	77 (19.3%)	1.64 (0.91; 2.97)	42 (10.5%)	1.03 (0.43; 2.47)	33 (8.2%)	1.05 (0.40; 2.76)
Gardnerella vaginalis	37 (9.2%)	0.68 (0.22; 2.09)	25 (6.2%)	0.68 (0.17; 2.64)	17 (4.2%)	0.50 (0.07; 3.40)
Ureaplasma urealyticum	2 (0.5%)	9.0* (6.81,11.8)	6 (1.5%)	6.2* (3.30; 11.7)	3 (0.7%)	9.1* (6.93; 12.1)
Streptococcus agalactiae	5 (1.2%)	0	3 (0.75%)	0	4 (1.0%)	0
Myoplasma hominis	2 (0.5%)	9.0* (6.81; 11.8)	1 (0.2%)	8.82 (6.70; 11.6)	1 (0.2%)	8.82 (6.70; 11.6)
Neisseria gonorrhoeae	0		0		0	
Listeria monocytogenes	0		0		0	
Chlamydia trachomatis	0		2 (0.5%)	4.40 (1.07; 18.0)	0	
Mixta	11 (2.7%)	0 (0.44; 8.5)	11 (2.7%)	0	8 (2.0%)	0
Otros**	15 (3.7%)	1.16 (0.32: 4.34)	8 (2.0%)	3.4* (1.33; 8.6)	2 (0.5%)	4.4 (1.07; 18.0)

*Estadisticamente significativo ($p \leq 0.05$)
**Incluye infección por *Trichomonas vaginalis, Escherichia coli,* enterococos, *Serratia, Proteus* y *Klebsiella.* Los cultivos para *Neisseria gonorrhoeae* y *Listeria monocytogenes* fueron negativos en cada una de las etapas del embarazo investigadas, en todas las pacientes.

factores de riesgo y pronóstico del parto pretérmino.

Los resultados de este trabajo, muestran una clara asociación entre la presencia de infección cervicovaginal y el desenlace de parto pretérmino, la consistencia de la asociación entre infección por *Ureaplasma urealyticum* y parto pretérmino en las diferentes etapas de la gestación estudiadas, la hacen un marcador pronóstico tanto de parto pretérmino , como del resultado perinatal adverso. La asociación observada entre infección por *Ureaplasma urealyticum* y RPM en esta etapa del embarazo, cabe destacar que de los nueve casos de infección por *Ureaplasma urealyticum,* en un caso hubo además muerte fetal a las 28 semanas de gestación y en dos casos más, inmadurez fetal (uno sin presentar RPM). En cuatro casos se presentó el parto antes del término y en dos, a término (uno sin presentar RPM). Este hallazgo contrasta con lo reportado por Yoon y col.[16]

Cuadro III

Análisis de regresión logística de los factores de riesgo paraparto pretérmino, en diferentes etapas del embarazo de 398 pacientes

Característica	Etapa del embarazo 16-24 sem	25 a 32 sem	33 a 42 sem
Factor de riesgo	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
Candida albicans	1.77 (0.88-3.55)	1.03 (0.38-2.79)	1.06 (0.35-3.16)
Gardnerella vaginalis	0.65 (0.19-2.21)	0.65 (0.14-2.85)	0.46 (0.06-3.60)
Ureaplasma urealiticum	—	16.6 (2.9-93.7)*	—

OR=Razón de momios
*Estadisticamente significativo ($p = 0.001$)

Aunque ya es bien conocida la asociación entre infección urinaria y parto pretérmino, llama la atención , el hallazgo de infección cervicovaginal por *Escherichia coli* y parto pretérmino, ya que en los últimos reportes no se ha mencionado esta asociación. A diferencia de la vaginosis bacteriana reportada por Goldenberg y col.[13] en este estudio la infección cervicovaginal por *Gardnerella vaginalis* no se asocia en forma significativa con parto pretérmino. ■

■ Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. The incidence of low birth weigth: A critical review of available information. World Health Stat 1980; 33: 197.
2. lams J. Prevention of preterm birth. N Engl J Med 1998; 54-6.
3. Hack M, Merkatz IR. Preterm delivery and low birth weight-a dire legacy. N Engl J Med 1995; 333: 1772-4.
4. Fanaroff AA, et al. Very-low-birth-weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network (1991-1992). Am J Obstet Gynecol 1995; 173: 1423-31.
5. Joseph KS, Kramer MS, Marcoux S, Ohlsson A, Wen SW, Allen A, et al. Determinants of preterm birth rates in Canada from 1981 through 1983 and from 1992 through 1994. N Engl J Med 1998; 339: 1434-39.
6. Higby K, Xenakis EM, Pauerstein CJ. Do tocolytic agents stop preterm labor? A critical and comprehensive review of efficacy and safety. Am J Obstet Gynecol 1993; 168: 1247-59.
7. Gyetvai K, Hannah ME, Hodnett DE, Ohlsson A. Tocolytics for preterm labor: A systematic review. Obstet Gynecol 1999; 94: 869-877.
8. Heppard MCS, Garite TJ. Preterm Labor. In: Heppard MCS, Garite TJ, eds. Acute Obstetrics. A practical guide. Second edition. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc. 1996: 161-182.
9. Gibbs RS, et. al. A Review of premature birth and subclinical infection. Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 1515-28.
10. lams JD. Premature birth.ln: Zuspan FP, Quilligan EJ, eds. Handbook of obstetrics, gynecology, and primary care. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc. 1998: 384-97.
11. Creasy RK, Resnik R. Maternal-fetal medicine, Third edition, Philadelphia, 1994, WB Saunders.
12. lams JD. Prevention and management of pretem birth. In Zuspan FP, Quilligan EJ eds. Current therapy in obstetrics and gynecology. 4th. edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1994; 283-7.
13. Goldenberg RL, lams JD, Mercer BM, Meis PJ, Moawad AH, Cooper RL, et al. The preterm prediction study: The value of new vs. standard risk factors in predecting early and all spontaneous preterm birth. Am J Public Health 1997; 88: 233-8.
14. Goldenberg RL, Thom E, Moawad AH, Johnson F, Roberts J, Caritis SN. The preterm prediction study: Fetal fibronectin, bacterial vaginosis, and peripartum infection. Obstet Gynecol 1996; 87: 656-60.
15. French JI, McGregor JA, Draper D, Parker R, McFee J. Gestational bleeding, bacterial vaginosis, and common reproductive tract infections: Risk for preterm birth and benefit of treatment. Obstet Gynecol 1999; 93: 715-24.
16. Yoon BH, Chang JW, Romero R. Isolation of Ureaplasma urealyticum from the amniotic cavity and adverse outcome in preterm labor. Obstet Gynecol 1998; 92: 77-82.

Y OBSTETRICIA DE MÉXICO

La cirugía pélvica como un marcador predictivo de la respuesta folicular a los inductores de ovulación

■ Dr. Alberto Kably Ambe, Dr. Oscar Aguirre Barrera, Dr. Guillermo Carpio Pertierra, Dr. Carlos Quesnel García-Benítez, Dr. Gerardo Barroso Villa

■ **RESUMEN**

Objetivo. Comparar la respuesta folicular en un grupo de pacientes con antecedente de cirugía pélvica sometidas a fertilización *in vitro*. ***Material y método.*** Se incluyeron pacientes que fueran a ser sometidas a estimulación ovárica controlada y fertilización *in vitro*. Se dividieron en dos grupos: uno con antecedente de cirugía pélvica previa y otro sin dicho antecedente. Se analizaron las características de edad, peso, índice de masa corporal, niveles de FSH, LH, estradiol así como número de óvulos totales, grado de madurez embrionaria y número de embriones transferidos. ***Resultados.*** Se estudiaron 99 pacientes: 46 tuvieron el antecedente de cirugía pélvica y 53 sin dicho antecedente. Por diseño de estudio no hubo diferencias en cuanto edad, peso, talla e índice de masa corporal; la evaluación de la reserva ovárica fue similar para ambos grupos. Sin embargo, el grupo de pacientes con antecedente quirúrgico presentó menor cantidad de óvulos totales (p = 0.004), un número menor de óvulos maduros (p = 0.008) con una tasa de embarazo significativamente menor. ***Conclusiones.*** Es probable que los procedimientos quirúrgicos junto con procesos adherenciales tengan una relación directa con las características del ambiente perifolicular que interfieren en el desarrollo ovular en forma adecuada. Todo esto se verá reflejado en una disminución de los procesos de fertilización y desarrollo embrionario independientemente de la expresión de marcadores bioquímicos de reserva ovárica adecuados. El presente estudio demuestra que en el grupo de estudio existe una respuesta folicular disminuida con un detrimento en la calidad óvulo-embrionaria expresada en la tasa de embarazo.

Palabras clave: cirugía pélvica, marcador predictivo, respuesta folicular, inductores, ovulación.

(Kably Ambe A. *et al.* La cirugía pélvica como un marcador predictivo de la respuesta folicular a los inductores de ovulación. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 210).

■ **ABSTRACT**

Objective. *Comparing the follicular response in a group of patients with previous pelvic surgery submitted to* in vitro *fertilization.* ***Material and methods.*** *Patients who were going to be submitted to controlled ovarian stimulation and in vitro fertilization were included. Two groups were formed: one with those patients who had had a previous pelvic operation and the other with those patients who had not. The characteristics which were analyzed included: age, weight, body mass idex, FSH, LH and estradiol levels, as well as total ova numbers, grade of embryonic maturity, and number of transferred embryos.* ***Results.*** *Ninety nine patients were studied: 46 had been submitted to pelvic surgery and 53 had not. Due to the design of the study there were no differences regarding age, weight, size and body mass index; the evaluation of the ovarian reserve was similar in both groups. However, the group of patients previously submitted to pelvic surgery presented a lower quantity of total ova (p = 0.004), less mature ova (p = 0.008) with a significantly lower pregnancy rate.* ***Conclusions.*** *Surgical procedures, combined with adherence processes, probably have a direct incidence on the characteristics of the perifollicular environment which interfere with adequate development of the ovum. All these can be observed in a de-*

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

crease of fertilization processes and embryonic development, regardless of the expression of the adequate biochemical markers of the ovarian reserve. Our research shows that the group under study presents a decrease in follicular response affecting the quality of the ovum-embryo expressed in the pregnancy rate.

Key words: pelvic surgery, predictive marker, follicular response, inducers, ovulation.

(Kably Ambe A. *et al.* Pelvic surgery as a predictive marker of follicular response to ovulation inducers. Ginec Obstet Mex 2002; 70: 210).

■ INTRODUCCIÓN

Uno de los factores fundamentales en el éxito de los tratamientos de las parejas infértiles lo constituye el manejo adecuado del problema de la anovulación. Ésta, cuando se presenta, puede ser causa hasta de 40% de los casos con diagnóstico de infertilidad. No obstante, su diagnóstico suele estimular al médico para establecer un pronóstico relativamente prometedor a la pareja que desea el embarazo ya que, bien tratada y como factor etiológico único suele tener expectativas de mejoría (ovulación) hasta de 80% y de embarazo de alrededor de 50%.

También en los programas de reproducción asistida es importante conocer cómo estimular el crecimiento folicular múltiple, ya que una menor calidad de ovocitos repercute en las tasas de fertilización y embarazo. Se ha utilizado una gran variedad de esquemas terapéuticos para la maduración folicular múltiple; en general, todos ellos son útiles de acuerdo con la experiencia de cada centro, así como a una serie de variables que ubican a la paciente dentro de un rango que incluye a las llamadas "buenas y malas respondedoras".

Los casos pueden diferir en cuanto a respuesta a la inducción de la ovulación en función de indicadores clínicos, de laboratorio, radiológicos y ultrasonográficos. Por ejemplo, una mujer de más de 40 años tiene una respuesta inferior ("más pobre") a la inducción de ovulación que una mujer de menos de 30 años, éste es un marcador clínico que la experiencia ha dado como predictivo, lo mismo puede ser dicho de los valores de FSH a principios del ciclo como un método para reconocer la respuesta folicular desde el punto de vista de laboratorio, y el tamaño del ovario y/o el flujo perifolicular cuando se analiza por ultrasonido. En el momento actual se reconoce que un volumen ovárico mayor con un flujo de bajos índices de resistencia conllevan a la presencia de una cuota folicular cuantitativa y cualitativamente mejor que si estas variables son contrarias.[1,2,4]

Independientemente de lo anterior hay observaciones previas que han ubicado a la paciente con adherencias pélvicas como mala respondedora, a pesar de que los indicadores clínicos, hormonales y de gabinete le confieran una posibilidad contraria. Se ha visto que la presencia de adherencias periováricas puede interferir con la difusión de gonadotrofinas exógenas del líquido folicular, lo que inhibe el crecimiento del folículo y por ende del óvulo mismo; por otro lado, se ha hipotetizado que las adherencias pélvicas pueden contener receptores a esteroides sexuales y producir factores de crecimiento angiogénico con la posibilidad de una influencia negativa en la formación de adherencias pélvicas.[5]

La concepción del trabajo actual nació de una apreciación empírica basada en el hecho, netamente observacional, de que el grupo de pacientes que son incluidas a programas de estimulación ovárica para el desarrollo folicular múltiple y que tienen antecedente de cirugías pélvicas tienen una respuesta menor al tratamiento hormonal cuando son comparadas con aquellas mujeres que no tienen el antecedente quirúrgico. Con la hipótesis anterior y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos que ubican a las adherencias pélvicas como un factor desfavorable en los programas de inducción de ovulación, se decidió evaluar qué tanto la cirugía pélvica, fenómeno en el que además de la posible génesis de procesos plásticos, lleva implícita la alteración de los sistemas de irrigación tisular y formación de grupos de sustancias deletéreas para la foliculogénesis tales como interleucinas, factor de crecimiento endotelial vascular (FCVE), de necrosis tumoral, formador de colonias y otras citocinas, pueden ser consideradas como un indicador clínico predictivo de la respuesta folicular tal como lo es la edad de la mujer o los niveles basales de gonadotrofinas.[6]

Un total de 99 pacientes fueron incluidas en forma retrospectiva en el periodo de enero a junio del año 2001 dentro de la Unidad de Reproducción Asistida de nuestro centro. Las características clínicas del grupo seleccionado permitie-

ron evaluar de manera uniforme dos grupos: aquellas con una o más cirugías pélvicas previas y otras sin antecedentes quirúrgicos.

Como puede observarse en el cuadro I, todas estas pacientes tenían sus variables clínicas y de laboratorio controladas de tal manera que desde estos puntos de vista se preludía una respuesta a la inducción de la ovulación similar en los dos grupos de estudio.

Se seleccionaron 46 pacientes con antecedente quirúrgico y 53 sin él, con condiciones similares de edad, peso, índice de masa corporal (IMC), valores basales de FSH, LH, estradiol.

Las 99 pacientes fueron sometidas a hiperestimulación ovárica controlada para fertilización *in vitro* con un esquema ya reportado anteriormente de administración de gonadotrofinas (Kably, 00), que brevemente, consistió en la administración de 300 UI diarias de FSH recombinante hasta obtener un desarrollo de cuatro o más folículos ≥ a 18mm antes de la aplicación de hCG y previos a la aspiración del ovocito.

Con el propósito de reconocer si la cirugía pélvica tiene influencia en la calidad de la inducción de la ovulación se evaluó el número de ampolletas (dosis utilizada de FSHr) por paciente, el pico de estradiol, el número total de ovocitos obtenidos así como su calidad, analizada en función de su madurez morfológica y número de embriones transferidos.

■ ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicaron pruebas paramétricas y no-paramétricas en los grupos control y de estudio así como en forma apropiada para su estudio. Los resultados fueron expresados como el promedio ± su desviación estándar.

Del total de pacientes que acudieron para fertilización *in vitro* en el periodo estudiado en nuestro centro, 99 de ellas reunieron los criterios de inclusión para hacer dos grupos apareados con variables similares (Cuadro I). De estas 99 pacientes, 46 tuvieron cirugía pélvica previa y 53 no tenían este antecedente; la edad varió de 27 a 35 años con una media de 32 para el grupo uno (con cirugía) y de 29.5 para el grupo dos (sin cirugía), los valores de gonadotrofinas determinados el día dos a tres del ciclo, así como del estradiol fueron similares en ambos grupos y nunca mayores de 9 mUI/mL para la FSH y LH y de 65 pg/mL para el estradiol. Las variables antropométricas fueron de igual forma similares y sin diferencia significativa para ambos grupos.

A pesar de lo anterior y de que el número de ampolletas (dosis) utilizada de FSHr, así como el pico de estradiol el día previo a la captura ovular fueron similares, se observó una tendencia estadísticamente significativa a obtener más ovocitos en el grupo de pacientes sin el antecedente de cirugía (15.1 óvulos por caso) que en aquellas con antecedente quirúrgico (8.4 óvulos por paciente), también fue notorio el hecho de que se obtuvieron ovocitos de mejor calidad en las mujeres sin antecedente de cirugía pélvica cuando se compararon con aquellas que sí la tenían (7.9 *vs.* 4.2 óvulos "maduros" respectivamente) (Cuadro II).

Uno de los objetivos en la historia de la medicina ha sido el realizar observaciones clínicas diarias que puedan servir de experiencia a quienes se dedican a esta profesión y poder tener puntos sencillos para ser considerados como parámetros de evaluación en la respuesta de un paciente a un determinado esquema terapéutico. En relación con la inducción de la ovulación, tema que ocupa a la presente comunicación, ha sido preocupación fundamental del clínico el contar con elementos que le permitan estimar que paciente tendrá una respuesta adecuada al tratamiento y diferenciarla de aquellas que no. Los costos y las expectativas que tanto la pareja como el médico tienen respecto al resultado de la terapéutica son lo suficientemente ele-

Cuadro I

Características demográficas de pacientes con factor tuboperitoneal con y sin antecedentes de cirugía tuboovárica

Variable	Con cirugía	Sin cirugía	p
Número de pacientes	(n=46)	(n=53)	
Edad (años)	32.4 ± 2.5	29.5 ± 3.5	ns
FSH (mUI/mL)	6.2 ± 2.7	6.1 ± 3.4	ns
LH (mUI/mL)	4.0 ± 2.3	3.8 ± 1.7	ns
Estradiol (pg/mL)	59.0 ± 27.1	83.4 ± 42.7	ns
Peso (kg)	62.4 ± 11.4	58.9 ± 5.7	ns
Talla (cm)	160 ± 53	157 ± 32	ns
Índice de masa corporal (IMC)	24.1 ± 3.6	22 ± 2.4	ns

Valores expresados como la media ± desviación estándar con un valor significativo de $p < 0.05$

Cuadro II

Resultados de los parámetros de estimulación ovárica por grupo

Variable	Con cirugía	Sin cirugía	p
Número de pacientes	(n=46)	(n=53)	
Número de ampolletas	23.5 ± 5.7	24.3 ± 8.4	ns
Grosor de endometrio (mm)	10.6 ± 1.49	10.0 ± 1.69	ns
Pico de estradiol (pg/mL)	3,818 ± 2,372	4,423 ± 2,861	ns
Día de hGC	14.4 ± 2.4	13.1 ± 1.5	ns
Número total de óvulos	8.4 ± 2.1	15.1 ± 2.2	0.004
Metafase II (MII)	4.2 ± 2.7	7.9 ± 3.6	0.008
Profase I (PI)	1.33 ± 1.4	7.13 ± 5.13	0.0004
Cigoto (2pN)	5.12 ± 3.59	6.25 ± 5.22	ns
Número de embriones transferidos	3.18 ± 1.5	3.8 ± 1.9	ns

Valores expresados como la media ± desviación estándar con un valor significativo de $p < 0.05$

vadas como para dejar al azar la respuesta.

Considerando lo anterior, se sabe por ejemplo, que la mujer que se acerca a la menopausia tiene una depleción cuantitativa y cualitativa de su cohorte folicular, depleción que se ve ejemplificada en la clínica por una pobre respuesta ovulatoria espontánea e inducida, así como por el fenómeno, en los programas de reproducción asistida, en donde se aprecia una tasa de fertilización, segmentación y embarazos menor conforme avanza la edad materna, además del hecho de verse significativamente incrementados tanto la posibilidad de aborto como de malformaciones congénitas.

Desde un punto de vista hormonal y fuertemente relacionado con la edad de la mujer, se sabe por demás que la elevación de las gonadotrofinas al principio de un ciclo menstrual por encima de las 15 mUI/mL, principalmente de la FSH, representan un factor pronóstico altamente negativo no sólo para la ovulación y captura de ovocitos, sino para la misma consecución de un embarazo.[1] También se ha mencionado que el volumen ovárico y su resistencia vascular se asocian con la respuesta óvulo-folicular.[4]

Por otro lado, se sabe que los procesos pélvicos adherenciales pueden influir en el aporte al ovario de gonadotrofinas alterando la circulación folicular ya sea por un fenómeno de "barrera" mecánica implícito en la presencia de las adherencias, así como también por deficiencias circulatorias creadas por una "mutilación quirúrgica vascular", de modo tal que a pesar de encontrarse los factores predictivos de una buena respuesta folicular normales, éstos sólo determinen marcadores periféricos que no reflejen lo que localmente puede suceder en el ovario en función de que el aporte hormonal puede verse limitado por situaciones mecánicas y circulatorias netamente pélvicas que no se reflejen a nivel sistémico.

Lo anterior fue la hipótesis general del presente trabajo que pretende reconocer un marcador clínico general y fácilmente identificable como es el antecedente de cirugía pélvica y poder estimar qué tanto, con los conceptos antes expuestos, puede predecir una repuesta a los inductores de ovulación su presencia o no independientemente de los demás factores. Los resultados obtenidos nos llevan a suponer que las pacientes que tienen antecedente de cirugía pélvica tienen una posibilidad de respuesta inferior a las gonadotrofinas exógenas basados en el hecho de contar con una cuota de ovocitos cuantitativa y cualitativamente inferior. Es cierto que habrá que estimar en un futuro otras variables tales como el número y tipo de cirugía efectuada pero es posible considerar por ahora que el antecedente quirúrgico pélvico en general debe de ser tomado en cuenta como una variable más para predecir la respuesta folicular a los inductores de la ovulación y que explica de una forma sencilla el porqué mujeres jóvenes con gonadotrofinas normales, estradiol adecuado, volumen ovárico normal y variables antropométricas prometedoras no responden de una forma adecuada. ■

Referencias bibliográficas

1. Muasher S, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis L, Liu H-C. The value basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1988; 50: 298-307.
2. Scott R, Toner J, Muasher S, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z. Folliclestimulating levels on cicle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. Fertil Steril 1989; 51: 651-4.
3. Toner J, Philput C, Jones G, Muasher S. Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. Fertil Steril 1991; 63: 1333-6.
4. Lass A, Silye R, Abrams D. et al. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. Hum Reprod 1997; 1028-31.
5. Barroso G, Barrionuevo M, Rao P, Graham L, Danforth D, Huey S, Abuhamad A, Oehninger S. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide and leptin follicular fluid levels correlated negatively with embryo quality in IVF patients. Fertil Steril 1999; 72: 1024-6.
6. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. Hum Reprod 1997; 12: 1047-55.