

Expresión de los oncogenes (c-myc-neu) y el receptor de prolactina (PRLr) en tejidos de mujeres con endometriosis

■ Dr. José M. Zamarripa L, Dra. Ma. Luisa Bermejo M, Dr. Héctor H. Bustos L, Dra. Julieta I. Castro R.

■ RESUMEN

La endometriosis es una enfermedad cuya etiología no se conoce y sobre la cual existen diferentes teorías que a la fecha no han sido totalmente demostradas. Está claramente demostrado que las mujeres que presentan dicha enfermedad cursan con infertilidad y que la recurrencia de aparición de los focos endometriósicos es alta, y al parecer no dependientes del estímulo estrogénico. Este fenómeno se ha atribuido a otros factores de crecimiento y algunos oncogenes los cuales son expresados para contrarrestar la falta del estímulo estrogénico. Sin embargo, pocos estudios existen en relación a los oncogenes u otros receptores hormonales, por lo que el presente trabajo tuvo por objetivo el evaluar su expresión tanto en tejido eutópico como en ectópico de mujeres con diagnóstico previo de endometriosis. El análisis de la expresión tanto de c-myc, neu y el receptor de prolactina (PRLr) se realizó por la técnica de RT-PCR. Nuestros resultados demuestran que tanto myc como el PRLr se expresan de manera distinta entre los diferentes tejidos, en tanto que neu se expresa de la misma manera entre los dos tejidos. Con estos datos concluimos que las células que conforman el foco endometriósico presentan un estado diferencial en

relación a la expresión de algunos de sus genes, lo cual favorece el desarrollo y mantenimiento de los mismos en un ambiente hormonal diferente al de la cavidad uterina.

(Zamarripa L., J.M. y col: *Expresión de los oncogenes (c-myc-neu) y el receptor de prolactina (PRL-r) en tejidos de mujeres con endometriosis*. Ginec Obst Mex 2000; 68:91).

■ SUMMARY

Endometriosis is a disease of unknown ethiology; there are several theories that are unproven. It is known that women with such disease present with infertility, and that recurrence is very high, and apparently not depending of estrogenic stimulus. This phenomenon has been attributed to other growth factors and some oncogenes. There are few studies about oncogenes or other hormonal receptors; so, this study tries to evaluate them in eutopic tissue and in ectopic one of women with previous diagnosis of endometriosis. Our results show that myc as PRLr are expressed differently in the different tissues; and neu is expressed in the same way in both tissues. So, it was concluded that the cells of the endometriotic foccus, have a differential status relating to expression of some of their gens, which target on their development and maintenance in a hormonal

environment which differs from the uterine cavity.

(Zamarripa L., J. M. y col: *Expression of oncogens (c-myc-neu) and the prolactin receptor (PRLr) in tissues of women with endometriosis*. Ginec Obst Mex 2000; 68:91).

La endometriosis es una enfermedad que clásicamente se define como la presencia de glándulas y estroma proveniente del endometrio fuera de la cavidad uterina, la cual está altamente relacionada con esterilidad de la mujer que la padece. El origen de esta patología se puede resumir en cuatro teorías: la del reflujo mecánico de células del endometrio hacia los ovarios y el peritoneo en cada ciclo menstrual, la teoría inmunológica que señala que las mujeres predispuestas a desarrollar endometriosis presentan un estado inmunológico óptimo para que las células se desarrollen en un ambiente diferente al útero. Además, existe la teoría de metaplasia celómica y la vía hematolinfática, que explican el desarrollo de implantes distantes al área del útero. Sin embargo, hasta la fecha ninguna de estas teorías ha sido del todo demostrada y aún falta mucho por estudiar.

Por otro lado, es bien aceptado que la presencia de estradiol circulante es un factor muy impor-

tante para el desarrollo de los focos endometriósicos, así como para su mantenimiento ya que la disminución de éste por medio de medicamentos o mediante la castración trae como consecuencia la desaparición de los mismos; sin embargo, el porcentaje de recurrencia de la enfermedad es cercano a 40%. (Waller K, 1993). Esto implica que no sólo el estradiol regula la proliferación de estas células, sino que tal vez existen otros mecanismos moleculares responsables de la proliferación y mantenimiento de estos focos endometriósicos. Con relación a este punto se ha venido proponiendo al "factor de crecimiento epidérmico" (EGF) y algunos oncogenes dependientes de estrógenos como el c-myc, c-jun, c-fos (Weiz A, 1988; 1990) como factores inductores de la proliferación de las células, cuya expresión pudiera darse aún en ausencia de estradiol. Se ha visto por ejemplo que existen diferencias entre la expresión de EGF y su receptor (EGFr) en tejido normal y endometriósico, demostrándose una alta expresión principalmente en el tejido endometriósico en el cual las concentraciones de receptor de estrógenos es bajo o nulo (Prentice A, 1992; Mellor, 1994). Recientes estudios han demostrado que una gran cantidad de células de vertebrados cuentan con numerosos genes que codifican para proteínas que son involucradas en la regulación celular y diferenciación. Estos genes son llamados protooncogenes por la gran similitud a los oncogenes virales que se presentan en el genoma de muchas células tumorales e inducen un crecimiento celular no controlado. Algunos de ellos se han sugerido como participantes activos en el crecimiento y diferenciación tanto del tejido en-

dometrial normal como el endometriósico. En el caso de los oncogenes como c-myc se han realizado pocos estudios y aún no existe un consenso general de si este oncogene es realmente relevante para el desarrollo de la endometriosis, ya que algunos autores señalan diferencias entre el tejido sano y el endometriósico y otros no han encontrado diferencias significativas (Shenken RS, 1991). Por otro lado, no existe información en la literatura relacionada con el papel de la prolactina y su receptor en la génesis y mantenimiento de la endometriosis y únicamente existen informes en animales con adenomiosis en donde se ha encontrado – por medio de técnicas de hibridación *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) – que la expresión del receptor de prolactina es mayor en el tejido con adenomiosis uterina, lo cual implica que posiblemente este receptor esté involucrado en el desarrollo de este tipo de patologías (Yamasita, 1997; 1999). Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo el demostrar si existen diferencias en la expresión cualitativa de los protooncogenes neu y myc y el receptor de prolactina, dependiendo del grado de endometriosis, el sitio de localización del foco endometriósico, así como entre el tejido endometriósico y el aparentemente

normal desde el punto de vista macroscópico.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se incluyeron 20 mujeres a las cuales técnicamente fue posible tomarles una muestra de tejido endometriósico previo consentimiento de las mismas. A cada una de las pacientes se les aplicó un cuestionario que incluía información general, antecedentes, motivo de consulta, duración del padecimiento, diagnóstico previo de endometriosis y tratamiento previo para endometriosis. Además se anotaron los hallazgos encontrados en la histerosalpingografía y en el tiempo postoperatorio.

Todas las muestras de tejido fueron colectadas durante la laparoscopia o laparotomía y clasificados de acuerdo a los criterios de la *American Fertility Association* (AFA). Los especímenes fueron congelados inmediatamente después de la toma de la muestra. Sólo en algunos casos fue posible tomar tejido aparentemente sano de la misma paciente. El diagnóstico macroscópico de estas muestras fue hecho por el cirujano que realizó la toma del tejido.

Una vez obtenidas todas las muestras se procedió a clasificarlas por grupos de acuerdo al sitio de la toma de la biopsia (Tabla I).

Tabla I

Clasificación de la muestra total por grupos

Grupo	Sitio de la toma de tejido
(Casos)	
I	Ovario derecho o izquierdo
II	Fondo de saco anterior o posterior, cuerpo, uterosacro
(Controles)	
III	Ovario, fondo de saco anterior y posterior, cuerpo
IV	Ovario

Todas las muestras fueron descongeladas en hielo y se procedió a realizar la extracción del RNA total por medio de la técnica de extracción con tiocianato de guanidina utilizando para ella el reactivo comercial Tripure (Laboratorios LakeSide). Posteriormente se procedió a la realización del RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los oncogenes c-myc, neu y para el receptor de prolactina humano. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la figura 1.

La síntesis del cDNA se realizó utilizando la SuperScript™ RNase H-Reverse Transcriptase (GibcoBRL, Life Technologies). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: el RNA se desnaturalizó a 90°C, 5'; posteriormente se dejó en hielo por cinco minutos. La reacción de síntesis se realizó durante una hora a 42°C. La RT se inactivó durante cinco minutos a 95°C y se incubó en hielo cinco minutos. La amplificación de los fragmentos obtenidos se hizo mediante PCR utilizando el GeneAmp® PCR reagent Kit con AmpliTaq® DNA polymerase (Perkin Elmer). Los ciclos utilizados para este paso fueron los siguientes:

1 ciclo: 5 min 94°C (hot start y adición de la mezcla de reacción)
2 min 94°C
1 min 65°C
1.5 min 72°C

35 ciclos: 30 seg 94°C
1 min 65°C
1.5 min 72°C
1 ciclo: 30 seg 94°C
1 min 65°C
7 min 72°C
hielo

Posteriormente los fragmentos se separaron en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, durante una hora. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de UV.

La diferencia en porcentaje de expresión de los oncogenes y el receptor de prolactina entre los diferentes grupos se hizo mediante la prueba de Chi-cuadrada considerando una $\alpha = 0.05$.

■ RESULTADOS

El total de pacientes incluídas en el estudio fueron 20, con un rango de edad de 25-45 con una media de 32.5. De estas mujeres se obtuvieron 20 muestras de tejido endometriósico (casos) y 12 aparentemente sano (controles). El grupo I quedó constituido de 11 muestras de endometriosis ovárica con un rango de puntaje de AFA de (150-16) con una media de 86. El grupo II quedó formado con las muestras de endometriosis extraovárica ($n = 9$) cuyo rango de puntaje AFA fue de (6-2) y una media de 3.5. El puntaje asignado a las pacientes de las cuales fue posible tomar muestra

aparentemente sanas ($n = 12$) tuvo un rango de (150-2) con una media de 72.4 (grupo III). Cuando únicamente se consideró a los controles de ovario para fines del análisis el rango de este grupo (IV) fue de (130-80) con una media de 99. (Tabla I).

En la figura 2 se muestra una fotografía representativa de las bandas obtenidas por medio de la técnica de RT-PCR en donde podemos observar que no en todos los casos se pudieron visualizar dichas bandas. Así mismo se puede ver que a pesar de que se utilizó la misma concentración de RNA (1 µg) en todos los ensayos, la expresión no fue siempre la misma entre una muestra y otra, lo cual hace suponer que la expresión de estos oncogenes o del PRLr varía entre una muestra y otra. El tamaño de las bandas en cada caso se puede ver en el pie de la figura.

Los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de los oncogenes y receptor de prolactina se ilustran en las tablas II, III, IV, V y se encuentran expresados como positivo (presencia de banda) o negativo (ausencia de la banda). Las diferencias entre porcentajes de expresión positiva entre los grupos I-IV para los oncogenes c-myc, neu y el receptor de prolactina se puede ver en la tabla VI.

■ COMENTARIO

Una de las áreas poco comprendidas hasta la actualidad en la ginecología es la endometriosis, se conoce claramente que esta entidad interfiere con la fertilidad no sólo desde el punto de vista mecánico, sino también bioquímico, hormonal e inmunológico. Hay experimentos clásicos en donde estimula la aparición de endometriosis acentuando la menstruación retrógrada,

Figura 1

Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR

c-myc	Up	5'GCA ACC CTT GCC GCA TCC ACG AAAC 3'
	Down	5' CTG TGG CCT CCA GCA GAA GGT GATC 3'
neu	Up	5' TGG CTC GGC TGC TGG ACA TTG AC 3'
	Down	5' GAA GCC CTG CTG GGG TAC CAG ATA 3'
*PRLr	Up	5' GTC TGG GCA GTG GTC TTG AAG GGC 3'
	Down	5' CAC TTG CTT GAT GTT GCA GTG AAG TTG 3'

*Boutin JM, Mol Endocrinol 3: 1455, 1989

y el estado hiperestrogénico. Estos estudios sugieren que los estrógenos sirven como estímulo primario para la formación del tejido endometriósico, posiblemente mediado por algunos factores proteicos a nivel molecular. Sin embargo, la regulación del desarrollo, crecimiento y diferenciación de esta entidad clínico-patológica se entiende poco.

Una serie de estudios ha mostrado que la respuesta del tejido con endometriosis a los estrógenos se manifiesta de manera heterogénea y raramente hay un ordenamiento morfológico de los implantes de manera cíclica como lo que ocurre en tejido eutópico.

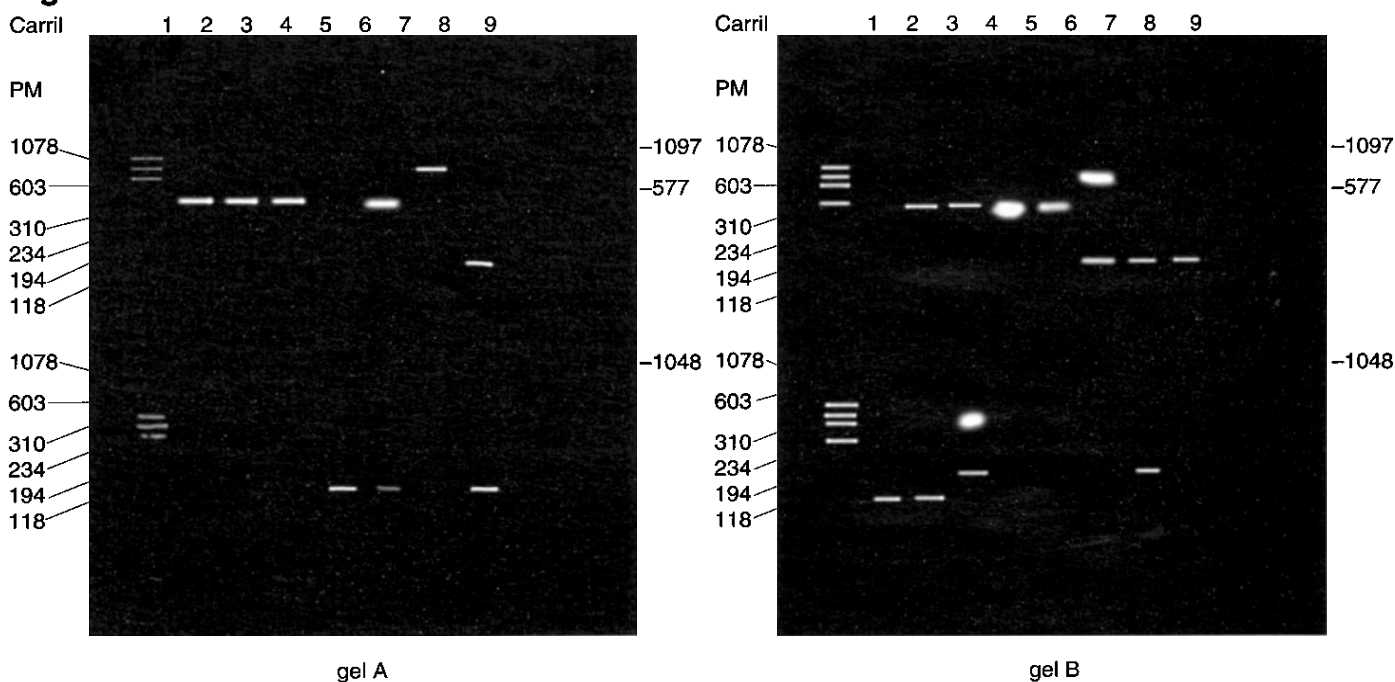
Así mismo, se ha demostrado que la expresión del receptor a estrógenos en el tejido endome-

triósico no se presenta de manera homogénea en todos los sujetos, lo que obliga a pensar que existen otros mecanismos adicionales que influyen en la etiología de esta patología (Agneta E, 1993). Desde hace mucho tiempo se conoce que las células contienen genes que codifican para proteínas necesarias para su regulación proliferativa y de diferenciación. Estos genes son llamados protooncogenes por la gran similitud a los oncogenes virales que se presentan en el genoma de muchas células tumorales e inducen un crecimiento celular en forma no controlada. Algunos de estos oncogenes son altamente dependientes del estímulo estrogénico, el cual induce la activación de los genes que los codifican; tal es el caso de los oncogenes c-myc y neu.

En el endometrio está claramente demostrada la expresión de estos dos oncogenes y su dependencia por los estrógenos, sin embargo en el caso de la endometriosis existe poca o nula información. En el presente trabajo pudimos demostrar lo siguiente:

a) En relación a los oncogenes neu y myc observamos que el porcentaje de expresión de neu en los diferentes grupos no muestra una diferencia significativa, lo que nos sugiere que este oncogene aparentemente no tiene relación con la proliferación y diferenciación de las células, sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que la expresión en el tejido aparentemente sano sea igual a la del tejido endometriósico, debido a que la manifestación se esté dando a

Fig. 2



Geles representativos (agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio), en los que se observa el patrón de corrimiento de las bandas amplificadas con la técnica de RT-PCR, de los oncogenes c-Myc (banda de 1097 pb), neu (banda de 577 pb) y PRLr (banda de 1048 pb). Geles A y B parte superior: pesos moleculares (carril 1); neu (carriles 2-6); c-Myc (carriles 7-9). Geles A y B parte inferior: pesos moleculares (carril 1); c-Myc (carriles 2-3); PRLr (carriles 4-8). Cada par de geles representa la amplificación en una misma corrida de los tres genes a partir del RNA de cinco pacientes.

nivel bioquímico y no se observen cambios a nivel macroscópico. Desafortunadamente no se realizó el análisis anatomopatológico que pudiera explicar esta observación. Además no es posible asegurar que estos cambios bioquímicos no preceden aún a los cambios histológicos.

b) En forma contraria, la expresión del oncogene myc sí parece ser un factor importante en endometriosis manifiesta macroscópicamente, ya que como se observó en la tabla VI, el porcentaje de tejidos que lo expresan el oncogene myc es mayor en el grupo control (III y IV) cuando se compara con grupos I y II (casos). Estos resultados sugieren que las células que conforman el foco endometriósico pierden su capacidad de expresión de este oncogene al momento de desarrollarse en un ambiente hormonal diferente al encontrado en cavidad uterina. Estos resultados son contrarios a lo referido por Schenken, 1991, quien utilizando métodos de localización inmunocitoquímica encontró la expresión de la proteína c myc en las células glandulares y del estroma, tanto en el tejido ectópico como eutópico. Aparte de este autor, no existen otros datos informados en la literatura, por lo que consideramos que sería importante el profundizar en el estudio de este oncogene.

c) Este mismo comportamiento se demostró para el receptor de prolactina, ya que se observó un porcentaje considerablemente mayor de biopsias con la expresión positiva del receptor en el tejido eutópico que en el endometriósico. Esto hace pensar que tal vez éste pudiera estar involucrado en el proceso de diferenciación de las células, por lo que sería interesante el estudiar el mecanismo molecu-

Tabla II

Grupo I

No.	AFS	PRLr	neu	myc	Tx
1	150	-	+	-	-
4	88	+	+	-	-
5	80	-	+	-	-
6	114	-	+	+	-
7	80	-	+	+	-
8	120	-	-	-	+
12	62	-	+	-	-
13	130	-	+	-	-
14	16	+	-	-	+
15	85	-	+	-	-
20	21	-	+	-	-

Número asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen neu expresado como positivo (+) o (-); myc: Oncogen myc asignado como (+) o (-). PRLr: Receptor de prolactina. Tx: recibió tratamiento previo (+) o no (-).

Tabla III

Grupo II

No.	AFS	PRLr	neu	myc	Tx
2	4	-	+	-	-
3	6	+	+	-	-
9	2	+	+	-	-
10	4	-	-	-	-
11	2	-	+	-	+
16	4	-	+	-	+
17	4	-	+	-	+
18	2	-	+	-	-
19	4	-	+	-	-

Número asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen neu expresado como positivo (+) o (-); myc: Oncogen myc asignado como (+) o (-). PRLr: Receptor de prolactina. Tx: recibió tratamiento previo (+) o no (-).

Tabla IV

Grupo III

No.	AFS	PRLr	neu	myc
1	150	+	+	-
3	6	+	+	+
4	88	+	+	-
5	80	-	+	-
6	114	-	+	-
7	80	-	+	+
8	120	+	+	+
9	2	+	+	-
11	2	-	-	-
13	130	+	+	-
15	85	+	-	+
17	4	-	+	-

Número asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen neu expresado como positivo (+) o (-); myc: Oncogen myc asignado como (+) o (-). PRLr: Receptor de prolactina. Tx: recibió tratamiento previo (+) o no (-).

lar de la prolactina y su receptor sobre este tipo de patología. Actualmente no existen estudios en esta área, sin embargo, se ha visto que el receptor de prolactina se encuentra incrementado en el útero del ratón con adenomiosis (Yamashita M, 1997) lo cual eleva la posibilidad de que este receptor pudiera jugar un papel importante en la fisiopatología de la endometriosis.

■ CONCLUSIONES

Con estos resultados podemos concluir que tanto el oncogene myc como el receptor de prolactina se expresan en forma diferente entre el tejido endometriósico y el eutópico; no así el oncogene neu el cual se expresa de manera similar entre ambos. Este hallazgo abre la posibilidad de que esta patología se encuentre regulada por diferentes factores, además del estímulo estrogénico, entre los que se encuentra la prolactina. Por lo cual será de gran importancia el conocer si estos tejidos tienen la capacidad de responder al estímulo con la propia prolactina y si dicha respuesta está

Tabla V

Grupo IV

No.	AFS	PRLr	neu	myc	Tx
4	88	+	+	-	-
5	80	-	+	-	-
6	114	-	+	-	-
7	80	-	+	+	-
8	120	+	+	+	+
13	130	+	+	-	-
15	85	+	-	+	-

Número asignado a cada paciente, AFS: Puntaje asignado de acuerdo a grado de endometriosis; neu: oncogen neu expresado como positivo (+) o (-); myc: Oncogen myc asignado como (+) o (-). PRLr: Receptor de prolactina. Tx: recibió tratamiento previo (+) o no (-).

Tabla VI

Porcentaje de expresión positiva de los oncogenes (c-myc, neu) y el receptor de prolactina (PRLr)

Grupo	PRLr	neu	c-myc
I	18.8	81.8	18.2
II	22.2	88.8	0.0
III	58.3	83.3	33.3
IV	57.0	85.0	42.0

$\chi^2 = 59.61$
 $p < 0.0001$

$\chi^2 = 2.2$
 $p > 0.52$

$\chi^2 = 56.87$
 $p < 0.0001$

relacionada con el incremento o decremento de la proliferación de las células endometriósicas. Consideramos que el conocimiento ac-

tual de estos mecanismos es muy pobre y que será necesaria la realización de más estudios para contestar esta pregunta.

■ REFERENCIAS

1. Agneta E, Marten F. *Estrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium: comparison according to localization and recurrence.* Fertil Steril 1993; 60(1): 63-8.
2. Mellor SJ, Thomas EJ. *The action of estradiol and epidermal growth factor in endometrial and endometriotic stroma in vitro.* Fertil Steril 1994; 62(3): 507-13.
3. Prentice A, Thomas EJ, Weddwl A, Mc Gill A, Randal BJ, Horne CHW. *Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study.* Br J Obst Gynecol 1992; 99: 395-8.
4. Schenken RS, Johnson JV, Riehl R. *C-myc protooncogene polypeptide expression in endometriosis.* Am J Obstet Gynecol 1991; 1031-7.
5. Weisz A, Bresciani F. *Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus.* Mol Endocrinol 1988; 2: 816-24.
6. Waller KG, Shaw RW. *Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up.* Fertil Steril 1993; 59: 51-15.
7. Yamashita M, Matsuda M, Mori T. *Increased expression of prolactin receptor mRNA in adenomyotic uterus in mice.* Life Sci 1997; 60(17): 1437-46.
8. Yamashita M, Matsuda M, Mori T. *In situ detection of prolactin receptor mRNA and apoptotic cell death in mouse uterine tissues with adenomyosis.* In Vivo 1999; 13(1): 57-60.

DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazos de término

■ Dr. M. C. Terrones S, Dr. J. Llamas V, Dr. F. Jaramillo J, Dr. M. G. Espino L, Dr. J. S. León B.

■ RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo y transversal. Fueron incluidas 10 pacientes sanas del Hospital Estatal de Ginecología y Obstetricia, que cursaron embarazo de término resuelto por vía abdominal. Durante la intervención quirúrgica se tomaron muestras de suero del cordón umbilical, suero y tejido adiposo materno. En todas las muestras, junto con la leche materna recolectada el día 10 del puerperio, se midieron las concentraciones de los siguientes plaguicidas organoclorados (POC): β -BHC, γ -BHC, heptacloro, aldrín, dieldrín, DDE, DDD, DDT y metoxicloro. Para las extracciones y purificaciones de los POC en los diferentes tejidos, se utilizó la metodología establecida por la EPA, (1980). La identificación y cuantificación de los plaguicidas se realizó mediante la comparación con estándares certificados por el NIST (*National Institute of Standard Technology*). Todas las determinaciones analíticas se realizaron en el Laboratorio de Estudios Ambientales del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. En promedio, las características generales de las participantes fueron: primigestas, de 24.1 años de edad, casadas y de nivel socioeconómico bajo. En cuanto a

los neonatos, de 39 semanas de edad gestacional, sexo femenino, de 3,311 g de peso corporal y talla de 51.1 cm. En todas las muestras analizadas se identificó por lo menos uno de los plaguicidas organoclorados estudiados. Los resultados del análisis de correlación entre las concentraciones de DDT total presentes en el suero materno con las identificadas en el tejido adiposo y suero del cordón umbilical fueron altamente significativas, $r = 0.97$ y 0.87 , respectivamente. En la leche materna se encontraron las concentraciones más elevadas de DDT total, con un promedio de 2053 ng/g base lipídica, lo cual representa 2.8 veces más, la ingesta diaria aceptada, establecida por la FAO/OMS (0.005 mg/kg/día, IDA). Asimismo, la concentración de DDT total en el suero materno guardó relación exponencial creciente con la edad ($r = 0.99$).

Palabras clave: Plaguicidas organoclorados, IDA.

(Terrones S, MC y col: DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazo de término. *Ginec Obst Mex* 2000; 68:97).

■ SUMMARY

Ten healthy patients with term pregnancy resolved by abdominal

via. During the surgical procedure samples of umbilical chord serum and maternal adipose tissue, were taken. In all the samples, together with the maternal milk collected the day 10 of puerperium, the concentrations of the following organochlorated plaguicides, were measured up: (PCC); β -BHC; γ -BHC; heptachloride; aldrin; dieldrin, DDE, DDD, DDT and methoxychloride. The identification and quantification of plaguicides was done by the comparison with standards certified by NIST (National Institute of Standard Technology). The general characteristics of the participants were: primigestas of 24.1 years aged, married and of a low socioeconomical level. As to the neonates, of 39 weeks of gestational age, feminine sex; 3,311 g of corporal weight and size of 51.1 cm. In all the analized samples at least one of the organochlorated plaguicides was present. The results of correlation analysis between DDT concentration, present in the maternal serum with those identified in the addipose tissue and serum from the umbilical chord were highly significant: $a = 0.97$ and 0.87 , respectively. In the maternal milk the highest concentrations of total DDT, were found, average of 2053 ng/g lipidic base, which is 2.8 times more of daily accepted intake. Likewise, DDT

concentration in maternal serum kept exponential relation, growing with age ($a = 0.99$).

Key words: Organochlorine pesticides, DAI.

(Terrones S, M.C. y col: *DDT and related pesticides in maternal milk and other healthy women's tissues with term pregnancies*. Ginec Obst Mex; 2000; 68:97).

El uso indiscriminado de plaguicidas para controlar diversos vectores de enfermedades endémicas o para aumentar la producción agrícola, así como la falta de una reglamentación precisa para su aplicación, han contribuido al aumento de la contaminación en el ambiente. Sin duda, la presencia de plaguicidas en cada nivel trófico de la cadena alimenticia representa una forma del mal uso que han tenido estos compuestos químicos desde su introducción a la vida socioeconómica del hombre (Redetzke, K., 1993). Según la información que existe en México, los principales contaminantes de origen ambiental en los alimentos son los plaguicidas organoclorados (POC) y sus metabolitos (Albert, 1987).

Se ha informado que, debido a sus propiedades químicas, estos compuestos son estables, persistentes y tienden a acumularse en el tejido adiposo en donde alcanzan concentraciones muy elevadas (Kaufer, M., 1984; Teschke, K., y col., 1993). Existen poblaciones humanas que son especialmente susceptibles a la exposición y efectos nocivos de los POC, como la mujer embarazada y el recién nacido (Kanja, 1992). Las concentraciones de los POC en la madre determinan las concentraciones de los mismos en el feto, a través de su paso por la placenta, de esta manera, el neonato se encuentra

expuesto durante la vida intrauterina y, si es amamantado, la exposición continuará en los primeros meses de vida extrauterina a través de la leche materna. Hasta la fecha, las repercusiones de dicha exposición en el ser humano no han sido completamente evaluadas (López Carrillo y col., 1996).

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, prospectivo y transversal; incluyó 10 pacientes que voluntariamente aceptaron participar, las cuales cursaron embarazo de término, con ausencia de enfermedades concomitantes y sometidas a operación cesárea en el Hospital Estatal de Ginecología y Obstetricia del Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes. Se excluyeron las pacientes embarazadas fumadoras activas, alcohólicas crónicas o con alguna enfermedad diagnosticada. El estudio fue realizado del 1 de junio de 1997 al 31 de diciembre de 1998. Las muestras obtenidas en quirófano fueron: 10 mL de sangre materna (sin anticoagulante), 10 mL de sangre del cordón umbilical (sin anticoagulante) y 50 g de tejido adiposo de la pared abdominal.

Las muestras de leche materna (30 mL) fueron obtenidas mediante extracción manual, a los 10 días del puerperio. Todas las muestras fueron depositadas en recipientes de vidrio limpios, enjuagados con acetona G.R. y hexano grado HPLC, con contratapas de teflón e identificados adecuadamente y se almacenaron a -20°C , hasta su análisis.

Cuantificación de POC en muestras biológicas

El procedimiento empleado en la extracción y purificación de los POC en las muestras analizadas es el reportado por la EPA (Environ-

ment Protection Agency, 1980) y modificado por Reyes y col. Se utilizaron estándares de plaguicidas organoclorados certificados por la EPA y trazados a NIST (National Institute of Standards and Technology). Los compuestos analizados fueron: hexaclorociclohexano (isómeros: β -HCH, γ -HCH), Heptacloro, Aldrín, Dieldrín, p,p-DDE, p,p-DDD, p,p-DDT y Metoxicloro. Los reactivos y disolventes utilizados fueron adquiridos de las casas comerciales J.T. Baker, Merck y Sigma. En todos los disolventes empleados se comprobó su pureza. La determinación cualitativa y cuantitativa de los POC se realizó mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones; se utilizó una columna capilar (30 m; ID 0.32 y $\text{df } 25\text{ }\mu$) y nitrógeno de alta pureza como gas acarreador. El análisis cualitativo y cuantitativo fue realizado mediante el programa computarizado P.E. Nelson Turbochrom y la Interface Series 900 Perkin Elmer Corporation.

El porcentaje de recuperación de muestras fortificadas libres de POC (gentilmente donadas por el Dr. Mariano Cebrián García del Laboratorio de Plaguicidas del CINVESTAV-Méx) fue de 70 a 110% y los coeficientes de variación de los duplicados al azar no fueron mayores a 10%.

Los POC fueron cuantificados en la fracción lipídica de las diferentes muestras biológicas estudiadas, de tal forma que los resultados se expresaron en ng de POC por gramo de lípidos totales (base grasa).

■ RESULTADOS

Características generales de las pacientes

El promedio de edad de las 10 pacientes incluidas en este estudio

fue de 24.1 años (17 a 36). En cuanto a la paridad, 4/10 cursaron su primer embarazo, 3/10 el segundo y el resto manifestaron cursar su tercera gestación o mayor. La mayoría de las pacientes (8/10) fueron clasificadas en un nivel socioeconómico bajo y el resto como medio-bajo. Por otro lado, los resultados del interrogatorio relacionados con el estado civil, indicaron que 9/10 pacientes manifestaron ser casadas y solo una refirió vivir en unión libre. Con relación a la escolaridad, 4/10 pacientes afirmaron haber cursado la secundaria completa, máximo nivel de escolaridad para nuestro universo, 2/10 la secundaria incompleta, 2/10 completaron la educación primaria y dos pacientes no terminaron la primaria.

Características generales de los recién nacidos

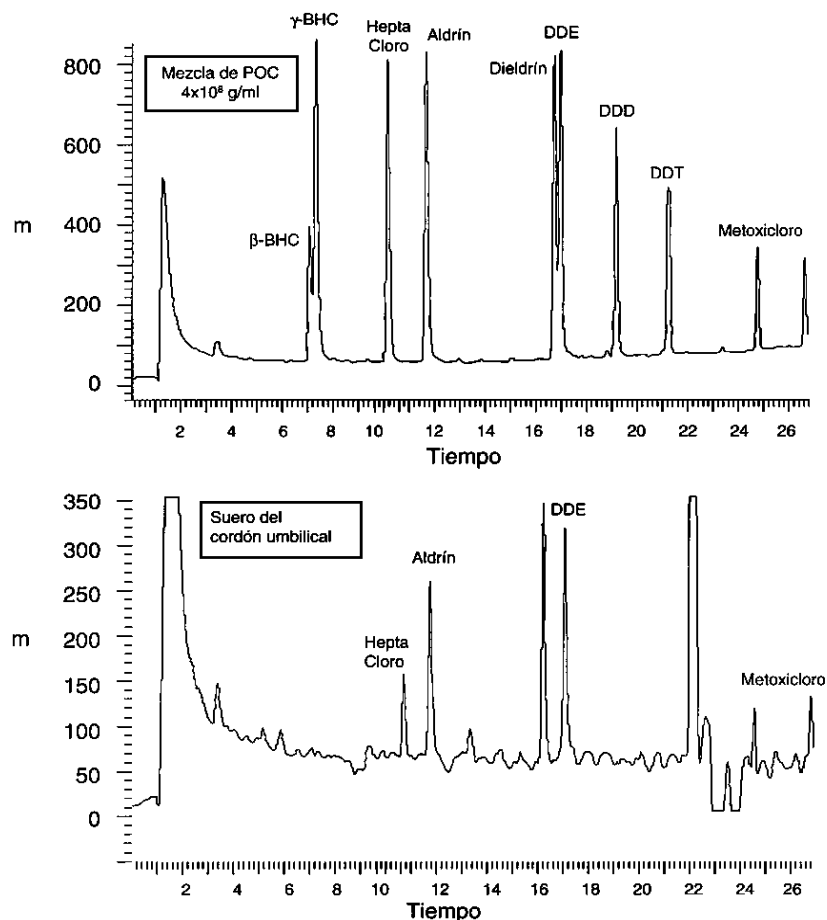
A través de la valoración clínica, realizada por el servicio de Pediatría del Hospital, todos los productos fueron considerados de término y calificados con un Apgar entre 8 y 9, al minuto y a los cinco, respectivamente.

Plaguicidas organoclorados

Análisis cualitativo

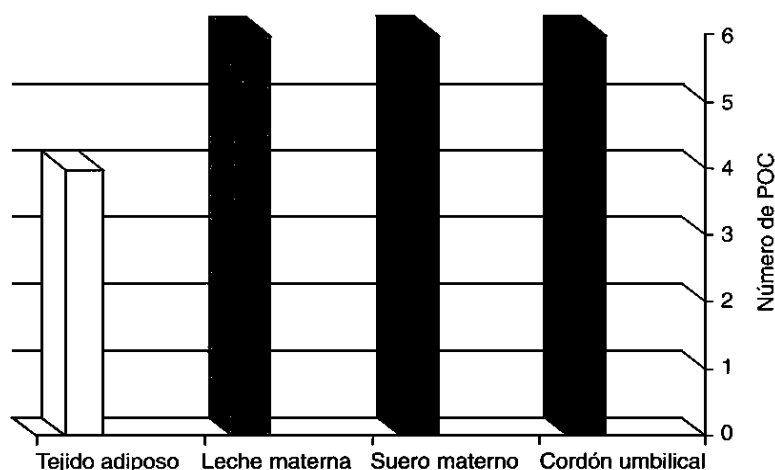
En todas las muestras analizadas se encontraron residuos de plaguicidas organoclorados. En la Fig. 1 presentamos el ejemplo de un cromatograma con la mezcla de estándares y en la parte inferior, otro de suero de cordón umbilical. Las muestras más contaminadas con POC fueron la leche, el suero materno y del cordón umbilical, en donde se detectaron hasta seis diferentes plaguicidas (Fig. 2). Los POC más frecuentemente fueron: el DDT total (suma del p,p-DDT y de

Figura 1



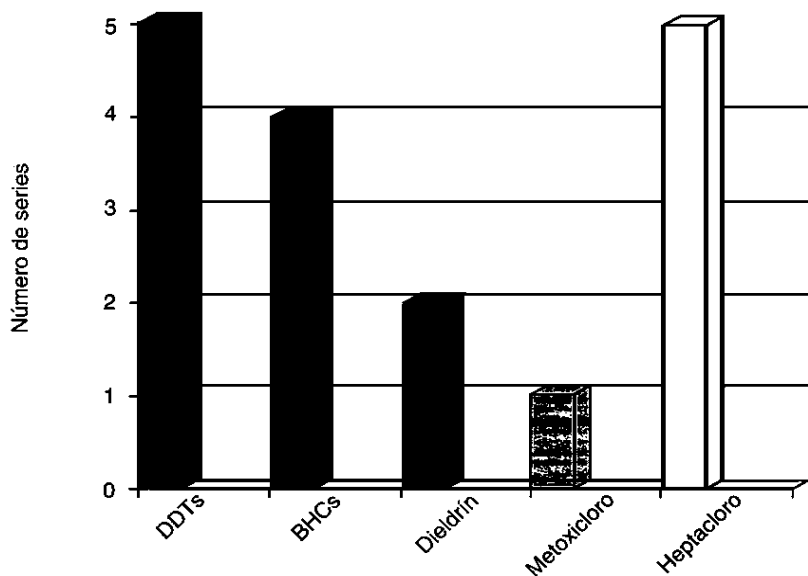
Cromatogramas correspondientes a la mezcla de estándares de POC y suero del cordón.

Figura 2



Número de plaguicidas organoclorados identificados en cada serie de tejidos analizados. En las muestras de suero y leche materna fueron detectados el mayor número de POC.

Figura 3



Tipos de plaguicidas organoclorados detectados en las diferentes series de tejidos analizados. El DDT total y el metoxicloro se encontraron en todas las series, mientras que el heptachloro solamente se encontró en el suero del cordón umbilical.

Tabla I

Concentraciones de POC en muestras biológicas. Se expresaron los valores promedio y el rango en ng/g base lipídica.

POC	Suero			
	Materno	Cordón umbilical	Tejido adiposo	Leche materna
DDT total	669 (143-2570) (n 10)	1323 (238-4321) (n 7)	1235 (0-6302) (n 10)	2053 7.6-10271 (n 10)
BHC total	669 (n 1)	236 (163-343) (n 2)	39 (17-71) (n 5)	82 (10-278) (n 8)
Dieldrin	117 (83-158) (n 3)	N.D.	N.D.	17 (10-24) (n 2)
Heptachloro	N.D.	666 (180-1869) (n 5)	N.D.	N.D.
Metoxicloro	287 (167-426) (n 3)	2090 (1198-2655) (n 5)	57 (33-81) (n 2)	251 (29-474) (n 2)

su principal metabolito *p,p*-DDE) y el metoxicloro.

De los BHC se detectaron los isómeros beta y gama (lindano),

denominados, en la Fig. 3, como BCH total; mientras que los menos frecuentes fueron el dieldrin y el heptachloro.

Análisis cuantitativo

En la Tabla I se presentan las concentraciones de los diferentes tejidos analizados. La mayor concentración de DDT total se identificó en la leche materna y, al igual que el metoxicloro, fueron los plaguicidas más frecuentes, mientras que el heptachloro se encontró solamente en el suero del cordón umbilical. Es importante mencionar que en las muestras de suero del cordón umbilical y tejido adiposo, las concentraciones de DDT total son semejantes y superiores a las del suero materno.

En todas las muestras estudiadas, se identificó por lo menos un metabolito del DDT, aunque las concentraciones de estos compuestos, en un mismo tipo de muestra, fueron muy diferentes en todas las pacientes (Tabla I). Además, en una misma paciente, existe correlación entre las concentraciones de DDT total presentes en los diferentes tejidos estudiados. En todas las muestras, la mayor contribución al DDT total estuvo determinada por el *p,p*-DDE.

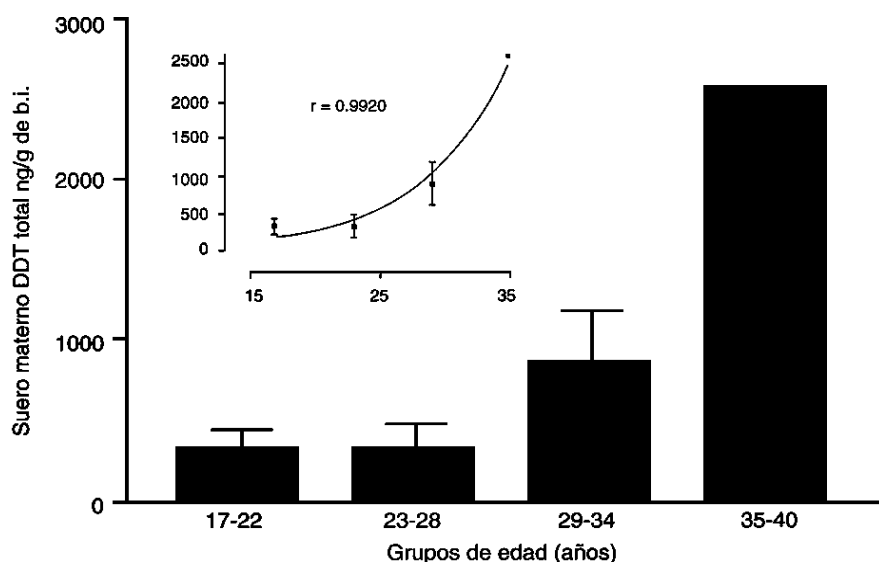
Relación entre la edad materna y las concentraciones de DDT total en suero

Las concentraciones de DDT total presentes en el suero materno guardan relación de tipo exponencial creciente con la edad. Las cantidades más elevadas se detectaron en el grupo de participantes de mayor edad, mientras que en las pacientes más jóvenes se registraron las concentraciones menores (Fig. 4).

COMENTARIO

El tipo de paciente que predominó en este estudio fue el de una mujer joven, primigesta de término, de nivel socioeconómico bajo, con un

Figura 4



Concentraciones de DDT total en suero materno en los diferentes grupos de edad. En el recuadro superior se presenta el análisis de correlación exponencial creciente.

grado académico básico y de procedencia predominantemente rural. De acuerdo con los registros del Hospital Estatal de Ginecología y Obstetricia, las características anteriormente descritas son las más frecuentes en la población usuaria de los servicios de esta institución. Conforme a los diagnósticos clínicos, en todos los casos, las indicaciones quirúrgicas se realizaron por razones exclusivamente obstétricas.

Según el Servicio de Pediatría, todos los productos se consideraron de término y fueron diagnosticados como: recién nacidos sanos y eutróficos. Estos neonatos fueron amamantados con lactancia materna exclusiva, por lo menos hasta el momento de obtener la muestra.

Distribución de los POC en la población estudiada

En todas las muestras analizadas se identificó al menos un compuesto relacionado directamente con los POC.

Sin embargo, el tipo de plaguicidas o metabolito detectado varió considerablemente (Fig. 4). Es importante que entre los POC identificados en las diversas muestras analizadas, se encuentran algunos de uso restringido, tales como: el DDT, el γ -HCH (lindano) y el heptacloro.

La relación entre las concentraciones de DDE y DDT (DDE/DDT) permiten describir las características de la exposición: a medida que el valor aritmético de este coeficiente es mayor que la unidad y se incrementa, refleja una exposición no reciente al DDT (Kanja, 1992; Mes, 1994; Hernández, 1993; Redetzke, 1993), además de la ingestión de alimentos contaminados preferentemente con DDE (Frank, 1993; Kashyap, 1994). En nuestros resultados, en términos promedio, 85.9% del DDT total corresponde al metabolito *p,p*-DDE (DDE/DDT 6:1), lo anterior nos permite postular que la mayoría de las pacientes no estuvieron recientemente expues-

tas al DDT. Diversos autores mencionan que en los países desarrollados (Polonia, Canadá, Noruega y España), en donde el uso de estos plaguicidas está restringido y la aplicación del marco legal es muy estricto, la relación DDE/DDT se ha incrementado a través del tiempo (Mes, 1994; Hernández, 1993; Czaja, 1997; Skaare, 1988). Para el caso de países en vías de desarrollo (India, Kenya, Nueva Guinea y Nicaragua) en donde actualmente se utiliza DDT con fines agrícolas o sanitarios, es común identificar en las muestras biológicas principalmente el *p,p*-DDT (Kanja, 1992; Kumar, 1996; Spicer, 1993; Rugama, 1993).

La presencia de DDT total en suero materno y tejido adiposo han sido considerados como parámetros que permiten estimar la magnitud de la exposición a estos compuestos (Bhatnagar, 1992; Rosell, 1993). En nuestros resultados, las concentraciones promedio de DDT total presentes en el tejido adiposo (1235 ng/g), fueron: 2.14, 14.8 y 20 veces inferiores a las observadas en Puebla, Torreón y Veracruz, respectivamente (López Carrillo, 1996). Al comparar los valores de DDT total en el tejido adiposo de nuestro trabajo con los informados en otros países, encontramos: 2.2 y 1.25 veces superiores a los detectados en Alemania y EUA (Waliszewski, 1995).

Con relación a las concentraciones de DDT total en suero materno, el valor promedio encontrado en nuestro estudio fue de 669 ng/g, concentración 8.7 veces inferior a la reportada por Bhatnagar y col en 1992 en la India, país en donde, hasta la fecha, se permite la utilización del DDT y BCH, en la agricultura y en la salud pública (Kumar, 1996).

Los resultados del análisis de correlación lineal entre las concentraciones de DDT total en suero materno y tejido adiposo son altamente significativos ($r = 0.97$; $P < 0.0001$). De acuerdo con los parámetros anteriores, existe una estrecha relación entre estas variables. Resultados similares han sido reportados por diferentes autores (Sasaki, 1991; Kanja, 1992). Lo anterior confirma la utilidad de estas determinaciones analíticas como indicadores de exposición a los POC.

Recientemente se ha asociado la presencia de DDT total en suero con la prevalencia de cáncer de mama. Wolff (1993) informó un incremento de 3.68 veces la probabilidad de padecer cáncer de mama con valores de 19 ng/mL de DDT total en suero. Sin embargo, otros autores no han encontrado una relación significativa entre estas variables (Krieger, 1994). Es importante mencionar, que de acuerdo a nuestros resultados, sólo 1/10 pacientes presentó valores superiores a los 19 ng/mL de DDT total.

En el suero del cordón umbilical se identificaron diferentes POC (Cuadro No. 1); resultados similares han sido obtenidos por otros autores, tanto en suero del cordón umbilical como en el suero del recién nacido (Skaare, 1988; Kanja, 1992; Nair, 1996). Lo anterior confirma la capacidad de estos compuestos para difundir a través de la placenta y llegar al producto. De acuerdo a nuestros resultados, las concentraciones de DDT total en el suero del cordón umbilical fueron superiores a las encontradas en el suero materno. Además, los resultados del análisis de regresión lineal ($r = 0.87$; $P < 0.0008$), nos permiten proponer una relación altamente significativa entre las

concentraciones de DDT total del suero materno y suero del cordón umbilical. Kanja y col. (1992), informaron concentraciones de DDT total en suero del cordón umbilical menores que en suero materno y bajos coeficientes de correlación entre estos parámetros. Sin embargo, Skaare (1988) encontró resultados distintos en dos grupos de mujeres con diferentes grados de exposición. Lo anterior demuestra que existen grandes variaciones en los resultados como consecuencia de consideraciones metodológicas y de factores no controlados, en poblaciones humanas expuestas.

Según nuestros resultados, la concentración promedio de DDT total en leche materna (2053 ng/g), fue tres veces mayor que la del suero materno. Nair en la India (1996) y Kanja y col. (1992), reportaron concentraciones de DDT total en leche materna 2.3 veces superiores a las encontradas en este estudio, aunque la proporción suero materno/leche materna fue similar. En contraste, Hernández y col. (1993) y Shaare y col. (1988), cuantificaron DDT total en leche materna en España y Noruega, respectivamente, y observaron concentraciones promedio 3.3 y 2.5 veces inferiores a las de este trabajo.

Es necesario considerar que la leche materna es, en un cierto estadio del desarrollo biológico, el único alimento para el neonato. Por otra parte, existe consenso en la bibliografía, y en nuestros resultados, de que la leche es una de las más importantes vías de eliminación de POC (Hayes, 1991). De acuerdo con lo anterior, muchos recién nacidos están expuestos, durante la etapa de la lactancia, a una importante carga de POC, e, inclusive, proporcionalmente mayor que para los adultos (Viveros,

1988). Por otra parte, aunque existen informes que enfatizan los efectos hepato y neurotóxicos de algunos POC, son escasos los estudios que analizan los efectos tóxicos por exposición crónica al DDT y sus metabolitos sobre el desarrollo ontogénico del sistema nervioso en los primeros meses de vida (Casa-rett, 1986; Fernícola, 1985; Barros, 1994; Lembowicz, 1991).

La importancia toxicológica de la presencia de DDT total en leche materna, no es fácil de evaluar. La Organización Mundial de la Salud (1986) estableció como ingesta diaria aceptada (IDA) para el DDT total, la cantidad de 0.005 mg/kg/día (tomando como referencia la leche de vaca entera y calculada para un adulto). Este valor representa la cantidad máxima permisible de DDT que se puede ingerir en un día, durante la vida, sin que se manifieste daño aparente al organismo (Albert, 1997). Es necesario considerar que este parámetro fue establecido para una persona adulta, la cual presenta condiciones fisiológicas diferentes a las que prevalecen en el recién nacido. Además, no es posible determinar si la exposición a valores establecidos en la IDA carece de riesgos, aunque se sabe que representan un nivel aceptable del mismo, sin embargo, este parámetro no es garantía de seguridad (Albert, 1997).

Tomando como referencia la cantidad de DDT total presente en la leche materna, así como los siguientes parámetros promedio: 3,000 g de peso corporal y un consumo de 700 mL/día de leche con 3% de lípidos, se calculó al ingesta diaria estimada (IDE) para el DDT total, en los neonatos que participaron en este estudio. Como se puede observar en la Fig. 5, 4/

10 muestras de leche materna exceden, desde 3.4 a 14.3 veces la IDA; así mismo, el coeficiente promedio IDE/IDA fue de 2.8 (rango 0.009-14.4). Esto significa que, en promedio, la ingesta diaria de DDT total en los recién nacidos estudiados fue 2.8 veces mayor que la permitida para un adulto.

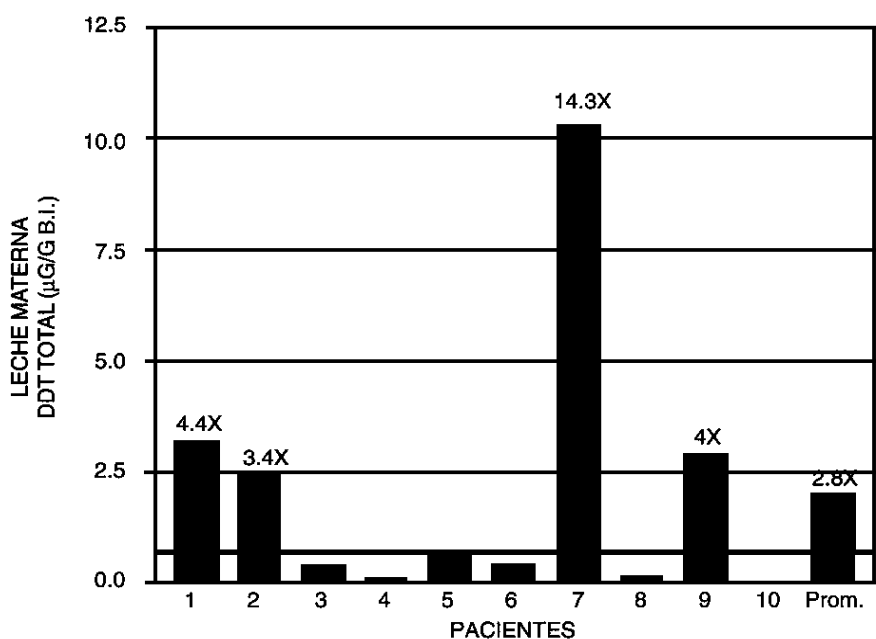
Consideramos que los resultados anteriores cobran especial importancia si tomamos en cuenta que actualmente diversas organizaciones internacionales (UNICEF) han promovido, sobre todo en países en vías de desarrollo, la práctica de amamantar al recién nacido.

Sabemos que la leche materna constituye, por muchos motivos, el alimento ideal para el recién nacido; sin embargo, existe la posibilidad de que ésta contenga concentraciones toxicológicas importantes de diferentes xenobióticos, tales como los POC.

Existen diferentes circunstancias ambientales, laborales y nutricionales que influyen en la magnitud de la exposición a los POC (Rivero, 1997; Albert, 1997).

Las características fisicoquímicas de los POC determinan su gran estabilidad en el ambiente y su capacidad para acumularse en la cadena alimenticia, en donde el hombre es el reservorio final. Tomando como referencia lo anterior, es factible considerar una estrecha relación entre la acumulación de estos compuestos en los tejidos y la edad. Varios autores han demostrado que las personas de mayor edad presentan concentraciones mayores de DDT total, tanto en tejido adiposo (Kashyap, 1993; Teschke, 1993) como en la leche materna (Mes, 1993). En nuestro estudio, la relación entre

Figura 5



Concentraciones de DDT en leche materna. La línea horizontal señala la ingesta diaria aceptada (IDA). En la parte superior de cada barra se establece el número de veces que sobrepasa la IDA.

la concentración de DDT total en el suero y la edad de las participantes (Fig. 4) se ajustó a un modelo de crecimiento exponencial ($r = 0.99$). Consideramos que los factores que influyen para que este fenómeno se presente posiblemente están relacionados con los hábitos alimenticios y la tendencia a la obesidad, que frecuentemente se presenta en esta etapa de la vida.

Los POC no relacionados con el DDT encontrados en las muestras estudiadas fueron los siguientes: b-BHC, y-BHC, dieldrín, metoxicloro y heptacloro. Conforme al marco legal que regula la utilización de los POC en México, el uso de dieldrín está prohibido, mientras que el DDT, el metoxicloro y el lindano sólo se pueden utilizar en campañas de salud pública, para el control de vectores de enfermedades

endémicas (Catálogo Oficial de Plaguicidas, 1993).

En el estado de Aguascalientes oficialmente no existen informes que señalen la utilización de estos plaguicidas para controlar brotes sanitarios. La presencia de estos compuestos en las muestras analizadas nos permite postular, por lo menos, las siguientes posibilidades: 1) que estos compuestos se utilizan de forma clandestina en nuestra región, 2) la ingestión de alimentos contaminados provenientes de otras regiones del país donde se utilizan POC para controlar brotes epidémicos de dengue o paludismo (Veracruz, Tabasco y Chiapas), o plagas que atacan cultivos agrícolas (Sinaloa, Tamaulipas, Durango, Coahuila y Chihuahua) (SARH, 1994); y 3) la más probable, es que ocurra una combinación de las dos anteriores.

■ REFERENCIAS

1. Albert L., Alpuche L. *Determinación de plaguicidas organoclorados en quesos de la Comarca Lagunera, México*. Toxicología (Uruguay) 1987; 2: 61-85.
2. Albert L. *Introducción a la toxicología de Ecología Humana y Salud*. Organización Panamericana de la Salud. OMS 1997.
3. Barros SBM, Pimente R, Simizu K, Azzalis LA, Costa IS, Junqueira VBC. *Dose-dependent study of liver peroxidation related parameters in rats treated with pp'-DDT*. Toxicology Letters, 1994: 7033-8.
4. Bhatnagar VK, Patel JS, Variya MR, Venkaiah K, Shah MP, Kashyap SK. *Levels of organochlorine insecticides in human blood from Ahmedabad (rural), India*. Bull Environ. Contamin Toxicol 48: 302-307 (1992). 1992; 48: 302-7.
5. *Catálogo Oficial de Plaguicidas*. Comisión Intersecretarial para el control de proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICLOPLAFEST) México, 1993.
6. Casarett & Doull's. *Toxicology, the basic science of poisons*. Third edition McMillan Publishing Company, 1986.
7. Czaja K, Ludwicki J. *Organochlorine pesticides, HCB and PCBs in human milk in Poland*. Bull Environm Contamin Toxicol 1997; 58: 769-75.
8. *EPA Manual of Analytical methods for the analysis of pesticides in humans and Environmental samples*. Sección 5ª. 10 y 11 United States, Environmental Protection Agency. 1980.
9. Frank R, Braun HE, Thorpe B. *Comparison of DDE and PCB residues in the general diet and in human blood-Ontario 1986-87*. Bull Environ Contami Toxicol 1993; 51: 146-52.
10. Fernicola NAGG. *Toxicología de los insecticidas organoclorados*. Bol Of Sanit Panam 1985; 98: 10-18.
11. Hayes WJ, Laws ER. *Handbook of Pesticide toxicology*. Vol. 1, Cap. 3, pp. 107-167, Academic Press, Inc., 1991.
12. Hernández LM, Fernández MA, Hoyas E, González MJ, García JF. *Organochlorine insecticide and polychlorinated biphenyl residues in human breast milk in Madrid (Spain)*. Bull Environ Contamin Toxicol 50: 308-315 (1993). 1993; 50: 308-15.
13. Kanja L, Janneche U, SBO Ojwang. *A comparison of organochlorine pesticide residues in maternal adipose tissue, maternal blood, cord blood, and human milk from mother/infant pairs*. Arch Environm Contamin Toxicol 22: 21-24 (1992). 1992; 22: 21-4.
14. Kashyap R, Iyer LR, Singh MM. *Evaluation of daily dietary intake of cichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) and benzene hexachloride (BHC) in India*. Arch Environm Health 49(1): 63-66 (1994). 1994; 49: 63-6.
15. Kaufer Martha. *Cómo suelen contaminarse los alimentos*. Cuadernos de Nutrición ene-feb 1984.
16. Kumar S, Kaushik A, Kaushik CP. *Assessment of infant exposure to chlorinated pesticide residues through contaminated mothers milk in Haryana, India*. Toxicological and Environmental Chemistry 1996; 55: 127-33.
17. Krieger N, Wolff MS, Rivera M. *Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among withe, black and asian women*. Journal of the National Cancer Institute 86: 589-599 (1994). 1994; 86: 589-99.
18. Lembowicz K, Sitarska E, Górski T, Ludwicki JK. *The effect of organic chlorine compounds and their metabolites present in human milk on newborn mice*. Toxicology letters 1991; 57: 214-26.
19. López Carrillo L, Torres Arreola L, Cebrián M. *Is DDT use a Problem Health in México?* Environmental Health Perspective 1996; 104: 584-8.
20. Mes J, Davies DJ, Doucet J, Weber D. *Levels of chlorinated hydrocarbon redues in Canadian breast milk and their relationship to some characteristics of the donors*. Food Addit Contamin 1993; 10: 429-41.
21. Nair A, Mandapati R, Dureja P. *DDT and HCH load in mothers and their infants in Delhi, India*. Bull Environ Cotamin. Toxicol 1996; 56: 58-64.
22. Redetzke KA, Applegate HG. *Organochlorine Pesticides in Adipose Tissue of Persons from El Paso, Texas*. Journal of Environmental Health 1993; 56: 25-7.
23. Rivero RL, Borja AV, Santos BC, Waliszewsky S, Ríos C, Cruz V. *Exposure assessment malaria in Veracruz, México*. Environ Health Perspectives 1997; 105: 98-101.
24. Rosell MG, Obiols J, Berenguer MJ, Guardino X. *Determination of chlorinated insecticides in blood samples of agricultural workers*. Journal of chromatography A. 1993; 655: 151-4.
25. Rugama R, Calero S, Fomsgaard I, Lacayo M, Martínez V, Pitty J. *Levels of organochlorine residues in blood plasma from three populations in Nicaragua*. Bull. Environm Contamin Toxicol 1993; 51: 153-9.
26. SARH Subsecretaría de planeación. *"Compendio estadístico de la producción pecuaria"*. 1989-93. Dirección general de información agropecuaria forestal y de fauna silvestre. 1994.
27. Sasaki K, Ishizaka T, Suzuki T, Takeda M, Uchiyama M. *Accumulation levels of organochlorine pesticides in human adipose tissue and blood*. Bull Environ Contam Toxicol 1991; 46: 662-9.
28. Skaare UJ, Andreas H. *Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in maternal adipose tissue, blood milk and cord blood from mothers and their infants living in Norway*. Arch Environ Contamin Toxicol 1988; 17: 55-63.
29. Spicer PE, Kereu RK. *Organochlorine insecticide residues in human breast milk: a survey of lactating mothers from a remote area in Papua, New Guinea*. Bull Environ Contam Toxicol 1993; 50: 540-6.
30. Teschke K, Kelly ShJ, Wiens M. *Concentrations of organochlorine pesticides in the adiposo tissue of British Columbia residents*. Revue Canadienne de Sante Publique 1993; 84: 192-6.
31. Viveros AD, Albert LA. *Estudios sobre plaguicidas en leche materna en México*. Ciencia y desarrollo mar-abril 1988, pp 83-90.
32. Waliszewski S, Pardio Sedas V, Chantiri Pérez JN, Infanzon Ruiz RM, Rivera Jaime. *Evaluación de los niveles de DDT y HCH en el tejido adiposo de algunas personas fallecidas en el estado de Veracruz, México*. Rev Int Contamin Ambient 1995; 11: 87-93.
33. Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N. *Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 1993; 85: 648-52.

Factor de necrosis tumoral- α e interleucina-1 β en los compartimentos intravascular materno, fetal y retroplacentario en parto a término y pretérmino

■ Dr. César Hernández-Guerrero,^a Dr. Javier Tenorio-Ramos,^b Dr. Felipe Vadillo-Ortega,^a Dr. Fabián Arechavaleta-Velasco,^a Dr. Luis Jiménez-Zamudio,^c Dr. José R. Ahued-Ahued,^d Dr. Jorge Beltrán-Montoya,^e Dr. Carlos Neri-Méndez.^f

■ RESUMEN

El nacimiento prematuro del neonato representa más de 80% de muertes perinatales, no atribuibles a malformaciones congénitas. A la fecha se desconocen las causas que originan el desencadenamiento de trabajo de parto pretérmino como a término. Evidencias experimentales involucran diversas citocinas inflamatorias en el inicio y/o mantenimiento del evento. El objetivo del trabajo fue determinar la concentración de TNF- α e IL-1 β en los compartimentos vasculares retroplacentario, fetal y materno en mujeres con embarazos a término y pretérmino que presenten trabajo de parto, y en mujeres con embarazos a término sin trabajo de parto. La determinación de las citocinas TNF- α e IL-1 β , se llevó a cabo mediante ensayos inmunoenzimáticos comerciales. Los resultados obtenidos de las citocinas aquí estudiadas, no mostraron diferencia estadística alguna (prueba t) al comparar los diferentes compartimentos intra e intergrupo. Sin embargo, la concentración de TNF- α muestra una tendencia a encon-

trarse en mayor proporción el ambiente fetal y retroplacentario, en los grupos con trabajo de parto (a término y pretérmino), comparada con el valor del grupo a término sin trabajo de parto. Del mismo modo, la concentración de IL-1 β mostró una tendencia de mayor concentración en los grupos de mujeres con trabajo de parto (a término y pretérmino), pero sólo en el compartimento retroplacentario. Las tendencias encontradas nos permiten proponer al compartimento retroplacentario y fetal, como los sitios blanco donde se sintetiza TNF- α e IL-1 β . Asimismo, la observación de la compartimentalización de ambas citocinas, parece indicar la existencia de un gradiente de síntesis que identifica al feto como productor inicial de TNF- α .

Palabras clave: Citocinas inflamatorias, Factor de necrosis tumoral- α , Interleucina-1 β , Parto pretérmino.

(Hernández G, C y col: *Factor de necrosis tumoral-alfa e interleucina-1 beta en los compartimentos intravascular materno fetal y retroplacentario en parto a término y pretérmino*. Ginec Obst Mex 2000; 68:105).

■ SUMMARY

Neonato preterm birth (before 37 pregnancy weeks) account more than 80% perinatal deaths not attributable to congenital malformations. Preterm and term labor full mechanisms are unknown at present. Proinflammatory cytokines direct participation have been involved in the phenomena by several experimental evidence. The study's aim was to determine TNF- α and IL-1 β concentration at maternal, fetal and fetal-maternal vascular compartments in women with term and preterm delivery and in women at term childbirth without labor. TNF- α and IL-1 β concentration were determined by commercial immunoassay. TNF- α concentration showed a tendency to be in more proportion at fetal and fetal-maternal compartments in preterm and term childbirth groups versus TNF- α concentration in term group without labor at same places. IL-1 β concentration showed same tendency of increase than TNF- α in preterm and term childbirth groups, but alone at fetal-maternal compartment. Statistical difference were not

Instituto Nacional de Perinatología, Méx., D.F.

^a Grupo de Investigación de la Subdirección de Investigación Biomédica

^b Investigador titular

^c Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.

^d Director General

^e Médico adscrito al Servicio de Embarazo de Alto Riesgo

^f Jefe del Departamento de Tococirugía

Trabajo premiado con el Tercer Lugar en Investigación Básica. 50° Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, Méx. D.F.

documented at any compartment or group compared. Data allow to identify fetal-maternal compartments as target places where TNF- α and IL-1 β were synthesized. Gradient concentration synthesis of cytokines allows to intend fetus as TNF- α initial producer.

Key Words: Proinflammatory cytokines, Tumor necrosis Factor-alpha, Interleukin-1 beta, Preterm birth.

(Hernández G, C y col: *Tumor necrosis factor alpha and interleukin beta at maternal, fetal and fetal maternal intra-vascular compartments in term and preterm outcome*. Ginec Obst Mex 2000; 68:105).

La gestación en la especie humana se prolonga durante 37 a 40 semanas, en este lapso acontecen las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas que permiten autonomía al producto una vez abandonado el seno materno. Sin embargo, en alrededor de 10% de todos los embarazos, la permanencia del producto *in utero* no alcanza el valor límite inferior de madurez presentándose parto pretérmino; que se define como el nacimiento del producto antes de que se completen 37 semanas de gestación (menos de 259 días) a partir del primer día del último período menstrual.

El parto pretérmino es la causa de mayor mortalidad perinatal, ya que a ella se deben más de 75% (hasta 90% en países subdesarrollados) de las muertes neonatales no atribuibles a malformaciones congénitas.¹ En el área obstétrica, esta patología ha sido la más importante durante los últimos cuarenta años, en que ha permanecido sin cambio en lo referente al porcentaje acontecido año con año.^{2,3}

A la fecha se desconocen en la mayoría de los casos las causas que

originan el parto pretérmino, identificándose asociación con diversas variables por lo que el evento se postula como rígido bajo un proceso multifactorial. En forma general y sin perder en cuenta la complejidad del evento, es posible destacar tres grandes rubros asociados a la aparición de parto pretérmino. El más común de estos es la ruptura prematura de membranas amnióticas, que es responsable de 30 a 40% de todos los casos de parto pretérmino. En un porcentaje parecido al anterior, es imposible encontrar una causa aparente, por lo que se le denomina idiopático. El último rubro que alcanza valores entre el 20 al 30% lo suman causas obstétricas, donde la interrupción del embarazo antes de 37 semanas de gestación es debida a indicaciones terapéuticas.⁴

La explicación de los mecanismos involucrados en la aparición de parto pretérmino, parten de la premisa que se desconocen con precisión los eventos asociados en el inicio de trabajo de parto normal. En la explicación del evento patológico, se ha postulado que este simplemente se encuentra disociado en tiempo con respecto al suceso normal. Para la explicación del evento normal como patológico se han propuesto diversas hipótesis, dentro de las que podemos comentar en forma general abatimiento de progesterona, prostaglandinas, uterotoninas (distintas a prostaglandinas), citocinas inflamatorias, etc.⁵⁻⁸ Se ha postulado que el producto una vez que ha madurado, genera una serie de señales que viajando por difusión a través del líquido amniótico, contactan a las membranas amnióticas y decidua, estimulando la síntesis de las prostaglandinas PGF_{2 α} y PGE₂, las cuales inducen la contracción de músculo

liso del miometrio. Los estudios han mostrado que estas moléculas son capaces de inducir contracción de diferentes músculos lisos en estudios *in vitro*, incluyendo el músculo vascular liso y el músculo liso miometrial de mujeres no embarazadas. Se ha identificado a las membranas amnióticas (corion y amnios) así como a la parte materna (decidua y miometrio), como fuente en la síntesis de las prostaglandinas PGF_{2 α} y PGE₂.^{9,10} Por otro lado, diversas moléculas diferentes a las prostaglandinas con capacidad de mediar actividad tónica del miometrio, han sido involucradas en el inicio de trabajo de parto. En forma general se les denomina "uterotoninas", siendo la Endotelina-1 la molécula natural más potente identificada, con capacidad de inducir contracción de músculo liso del miometrio al realizar ensayos *in vitro*, que emplean células miometriales confluentes, o tiras del miometrio analizadas en forma *ex vivo*. Así mismo, se ha documentado que células en cultivo de corion y amnios son capaces de sintetizar endotelina-1, bajo estímulo de diversas citocinas inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α .^{11,12}

Las hipótesis de citocinas inflamatorias como mediadoras del trabajo de parto, se origina en estudios¹³⁻¹⁶ que han mostrado la presencia de interleucina-1 beta (IL-1 β , antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1AR), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el inicio y durante el trabajo de parto en muestras de líquido amniótico, obtenidas de mujeres con embarazos normales a término y pretérmino, así como en modelos animales utilizando primates (*Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina*) donde

ha sido posible monitorear los compartimentos amniótico, circulatorio fetal, circulatorio materno y circulatorio placentario.^{17,18} En todos los modelos mencionados se identifica un aumento en la concentración de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α en líquido amniótico y el ámbito periférico materno. Para el caso de las mujeres que presentaron parto normal este aumento sucede horas antes de que diera inicio el trabajo de parto.^{19,20} Al margen de su papel dentro de una posible cascada de eventos que conducen al parto, algunas citocinas como IL-1 β muestran una potente capacidad uterotónica.

El presente trabajo plantea determinar la concentración de las citocinas inflamatorias TNF- α e IL-1 β , en los ambientes periférico fetal, periférico materno y retroplacentario de mujeres que presenten parto pretérmino con ausencia clínica y microbiológica de infección, parto normal a término y en muestras de embarazos a término sin trabajo de parto, obtenidas mediante cesárea electiva.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Grupos de estudio

Se estudiaron mujeres entre 25 y 30 de edad, con características clínicas generales semejantes, las cuales resolvieron su embarazo en el Instituto Nacional de Perinatología durante el periodo comprendido entre el primero de junio y el 31 de diciembre de 1998. Según la edad gestacional y la presencia o ausencia de trabajo de parto, se incluyeron en alguno de los grupos de estudio descritos a continuación.

Grupo 1 (Pretérmino). Pacientes con embarazos entre 24 y 36 semanas de gestación, calculadas por fecha de última menstruación

(FUM) o por ultrasonido (US) realizado durante el primer trimestre de la gestación, corroborada mediante el método de Capurro¹⁹ aplicada a los recién nacidos. Con trabajo de parto y resuelto por vía abdominal o vaginal.

Grupo 2 (Término). Pacientes con embarazos mayores a 37 semanas de gestación, calculadas por FUM o por US realizado durante el primer trimestre de la gestación, resuelto por vía vaginal.

Grupo 3 (Testigo). Pacientes con embarazos mayores a 37 semanas de gestación, calculadas por FUM o por US realizado durante el primer trimestre de la gestación, sin trabajo de parto y resuelto por cesárea indicada por cualquier causa materna, obstétrica y fetal excepto las indicadas en los criterios de exclusión.

Para el caso de mujeres con embarazo normal a término con y sin trabajo de parto, se incluyeron cinco muestras para cada compartimento analizado, mientras que para los embarazos que presentaron parto pretérmino se incluyeron 17 muestras en los tres compartimentos.

Todas las pacientes incluidas en el estudio firmaron una carta de consentimiento, después de conocer los objetivos, procedimientos y riesgos del estudio.

Criterios de inclusión

1. Mujeres embarazadas sin complicaciones médicas como: diabetes mellitus, asma, artritis reumatoide, lupus eritematoso, hipertensión arterial sistémica crónica y nefropatías.
2. Sin complicaciones obstétricas como: malformaciones uterinas, placenta previa, acretismo placentario, preeclampsia, incompetencia ístmico cervical, síndrome antifosfolípido primario, óbito, polihidramnios y oligohidramnios severos.

3. Mujeres embarazadas sin alteraciones fetales, evaluadas clínica y ultrasonográficamente.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que no desearon participar en el estudio.
2. Mujeres embarazadas con evidencia clínica de infección, mediante historia clínica general.
3. Pacientes con cultivo positivo en orina y/o exudado cervicovaginal para: estreptococo del grupo B, *E. coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.
4. Pacientes con embarazos menores a 24 semanas de gestación.

Obtención y manejo de muestras sanguíneas

Para realizar la determinación inmunoenzimática de TNF- α e IL-1 β , se empleó plasma proveniente de sangre vascular de los siguientes sitios:

Sangre periférica. Se obtuvieron 10 mL de sangre venosa anticoagulada utilizando 2 miligramos (mg) de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Gybcó BRL, U.S.A) por mililitro (mL) de sangre, mediante punción de antebrazo al momento de la expulsión del producto en el área de tococirugía, en los casos de parto a término y pretérmino. Para el grupo de mujeres con embarazos a término sin trabajo de parto, la toma de la muestra se realizó durante la cesárea.

Sangre fetal. En los tres grupos estudiados la sangre se obtuvo en el área de tococirugía una vez expulsada la placenta, a partir de punción venosa del cordón umbilical, recuperándose 10 mL de sangre anticoagulada usando 2 mg de EDTA/mL de sangre.

Sangre retroplacentaria. En los tres grupos estudiados, la sangre se obtuvo en el área de tococirugía, a

partir de la parte materna en la placenta recién expulsada. Se colectaron alrededor de 10 mL de sangre empleando una pipeta Pasteur, los cuales se depositaron en un tubo con anticoagulante (EDTA), a una concentración de 2 mg/mL de sangre.

En todos los casos, las muestras sanguíneas fueron transportadas de inmediato al laboratorio donde fue separado el paquete celular del plasma, mediante centrifugación a 3500 r.p.m. durante 15 minutos a 4 grados centígrados (°C). El plasma recuperado fue puesto en alícuotas de 450 microlitros (µL) y almacenado a -70°C, hasta el momento de llevar a cabo los ensayos inmunoenzimáticos.

Cuantificación de citocinas TNF-α e IL-1β

La determinación de la concentración de las citocinas TNF-α e IL-1β, se llevó a cabo mediante ensayos inmunoenzimáticos cuantitativos tipo "sandwich" (ELISA) utilizando reactivos específicos (Genzyme Co. USA). En forma general se describe la metodología empleada. Se colocaron 100 µL de una solución de anticuerpos mononucleares de captura anti TNF-α o anti IL-1β en cada caso, en placas de ELISA de alta unión proteica (Marsilolb, Nunc Co. USA), a una concentración de 2 µg de proteína/mL de 4 µg de proteína/mL respectivamente. Una vez unido el anticuerpo de captura, se adicionaron 100 µL de suero proveniente de la sangre vascular materna, fetal y retroplacentaria de los grupos de estudio y grupo testigo, dejándose en incubación a temperatura ambiente por dos horas. Al término de la incubación la placa fue lavada para eliminar todo material no unido al anticuerpo monoclonal, con una

solución amortiguadora denominada de lavado la cual contiene Trishidroximetilaminometano 5 mili Molar (mM), Tween-20 al 0.01% y cloruro de sodio 15 mM, pH 7.4. Se adicionaron 100 µL del segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) conjugado con biotina en cada pozo de las placas, a una concentración de 2 µg de proteína/mL de solución para el caso de TNF-α y de 4 µg para IL-1β, los cuales se dejaron en incubación durante una hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación, la placa de ELISA fue lavada exhaustivamente con solución de lavado, adicionándose el conjugado de estreptavidina/fosfatasa alcalina diluida 1:1000, la que se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo de color se llevó a cabo mediante la utilización del cromógeno para-nitrofenilfosfato, determinándose la absorbancia de las muestras y curva estándar en un lector de ELISA marca Dynatech a 450 nanómetros de longitud de onda. La concentración de las citocinas en las muestras problema se determinó mediante interpolación de la absorbancia obtenida, en la curva de calibración de absorbancia *versus* concentración de la citocina estándar, realizada en cada ensayo para ambas citocinas. En todos los casos se analizó el coeficiente de correlación de la curva de calibración obtenida, así como el coeficiente de variación interensayo observado en los estándares bajo, medio y alto empleados en cada experimento de ambas citocinas.

■ RESULTADOS

Se incluyeron un total de 30 pacientes en el estudio, veinte correspondieron al grupo 1 (nacimiento pretérmino) y cinco a los grupos 2

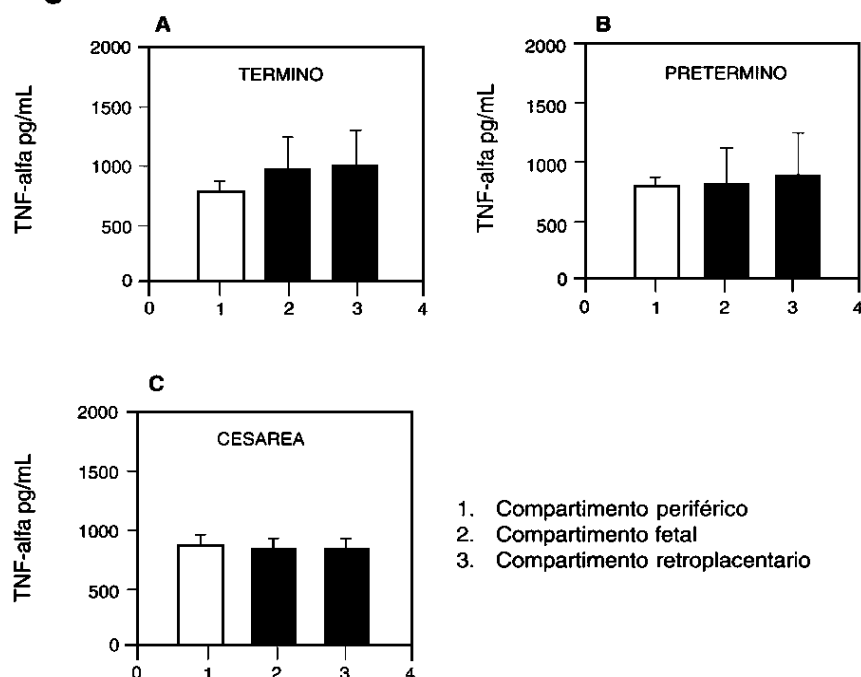
y 3 (nacimientos a término con y sin trabajo de parto respectivamente). Del grupo uno se excluyeron tres pacientes, dos por presentar corioamnionitis documentada por cultivo microbiológico y una más por desarrollo de preeclampsia durante el puerperio.

La edad, paridad y evolución del embarazo entre los tres grupos fue similar y no mostró diferencia estadística significativa utilizando prueba t (Mann-Whitney Rank Sum (Test)), datos no mostrados. Por otro lado, la edad gestacional fue diferente entre los grupos de nacimientos pretérmino y de término (32 ± 2 SDG *vs.* 38 ± 2 SDG) obteniéndose valores significativos estadísticos utilizando la prueba t antes señalada ($P < 0.05$).

La concentración de las citocinas TNF-α e IL-1β determinada mediante inmunoensayos enzimáticos en muestras de sangre periférica, sangre fetal (cordón umbilical) y sangre retroplacentaria, proveniente de mujeres que presentaron parto normal a término, parto pretérmino y embarazos a término sin trabajo de parto (cesáreas electivas), fue determinada en ensayos que mostraron curvas de calibración con coeficiente de correlación mayor del 0.95; con variación interensayo menor a 10% en los estándares bajo, medio y alto incluidos en cada experimento.

El análisis de la concentración de TNF-α obtenida en los diferentes compartimentos de los grupos estudiados, no mostró diferencia estadística al compararse intra e intergrupo mediante prueba t (Mann-Whitney Rank Sum Test). En el compartimento materno de los tres grupos el valor promedio y la desviación estándar de la concentración de TNF-α, mostraron valores muy parecidos con desviaciones

Figura 1



Factor de necrosis tumoral-alfa en los tres compartimentos de los grupos estudiados: A) Trabajo de parto a término; B) Trabajo de parto pretérmino; C) Término sin trabajo de parto.

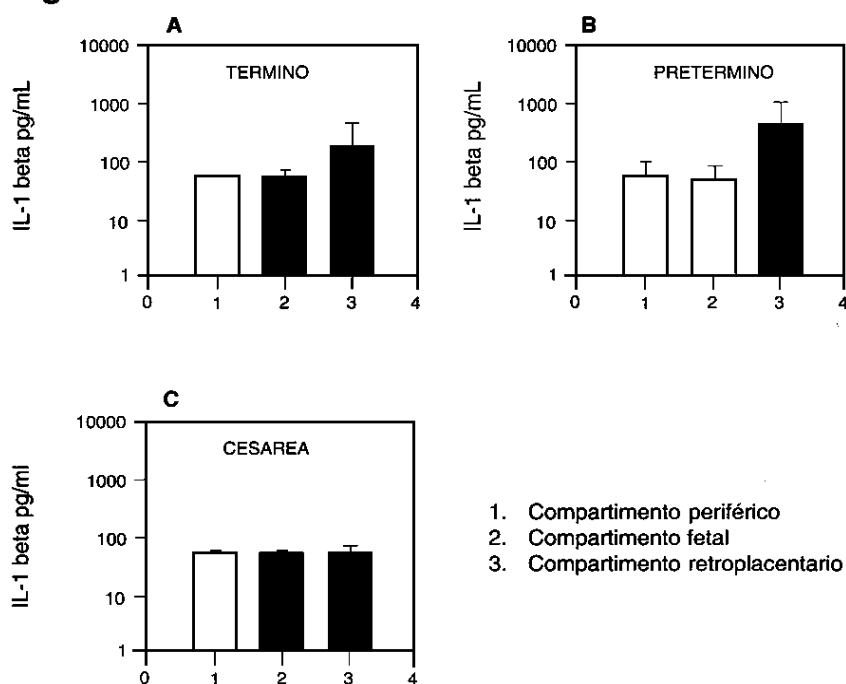
estándar pequeñas. Sin embargo, y aunque no existen diferencias estadísticas, es posible observar cierta tendencia a encontrar en mayor concentración esta citocina en los compartimentos fetal y retroplacentario, de los grupos de mujeres que presentan trabajo de parto (a término y pretérmino), al contrastarlo con el valor obtenido en los mismos compartimentos en el grupo a término sin trabajo de parto (figura 1).

Para el caso de IL-1 β no existió diferencia estadística alguna, al comparar los diferentes compartimentos en un mismo grupo y entre ellos, utilizando la prueba t (Mann-Whitney Rank Sum Test), pero al igual que con TNF- α es posible observar tendencias de mayor concentración de IL-1 β , en los grupos con trabajo de parto a término y pretérmino, al parecer de manera exclusiva en el compartimento retroplacentario, pues los valores promedio de la concentración de esta citocina en la parte materna de los tres grupos, así como en el ambiente retroplacentario de las mujeres con embarazo a término sin trabajo de parto, son muy parecidos con dispersiones muy pequeñas (figura 2).

■ COMENTARIO

Las citocinas inflamatorias son proteínas que median gran parte de la respuesta inmunológica, tanto específica como inespecífica en la defensa frente a organismos extraños como virus o bacterias. Estas moléculas son producidas por una gran variedad de estirpes celulares, siendo producidas en la inmunidad innata fundamentalmente por monocitos mononucleares.²⁰ Sin embargo, se ha observado que su participación tiene que ver con gran cantidad de procesos biológicos,

Figura 2



Interleucina-1 beta en los tres compartimentos de los grupos estudiados: A) Trabajo de parto a término; B) Trabajo de parto pretérmino; C) Término sin trabajo de parto.

que nos son exclusivos de la defensa del hospedero en contra de agentes patógenos.²¹⁻²³ En este ámbito, diversos autores han propuesto la participación de citocinas inflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 con aspectos involucrados en el trabajo de parto en forma normal como pretérmino.^{24,25} Las evidencias experimentales han logrado establecer fuertes vínculos entre la actividad mediada por diversas citocinas inflamatorias y mecanismos asociados en el inicio y/o mantenimiento del trabajo de parto. Empleando modelos animales de experimentación¹¹ se ha observado que la administración intrauterina de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α en forma simple o combinada entre ellas; inducen trabajo de parto y nacimiento prematuro al utilizar hembras preñadas de conejos, cobayos, ratones. Asimismo, las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α , son capaces de inducir la síntesis de prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2 α} en células amnióticas, coriónicas, deciduales y miometriales al cultivarlas *in vitro*. Dichas moléculas eicosanoides han sido señaladas preponderantes en el desarrollo de trabajo de parto (hipótesis de las Uterotoninas), debido a su capacidad para inducir la contracción de músculo liso del miometrio.²⁶ Al nivel de la expresión genética, Dudley analizó la presencia de mRNA en células provenientes de tejido amniótico, coriónico y materno (decidua) en muestras obtenidas a lo largo de la gestación, en grupos de mujeres con trabajo de parto a término y con parto pretérmino, logrando identificar una mayor expresión de mRNAs de las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los tres tejidos analizados, en las muestras de los grupos con trabajo de parto normal a término y pretér-

mino, siendo esta expresión menor en muestras provenientes de mujeres con embarazos del segundo trimestre, así como en embarazos a término sin trabajo de parto.²⁷

Los datos contenidos en la literatura, sin duda dan fuerte soporte para aceptar la participación de diversas citocinas inflamatorias en los mecanismos involucrados en el trabajo de parto. En este momento se desconoce si estas moléculas *per se* son las encargadas de señalizar el fin de la gestación del producto, o aparecen en respuesta al inicio de trabajo de parto. Aún más, se desconoce con precisión la fuente de inicio en su síntesis, pues existen datos en la literatura que apoyan la participación de células inmunitarias (monocitos/macrófagos) presentes en la interfase materno-feto-placentaria, en la producción de tales citocinas, así como células del corion, amnios y decidua, o asignan su origen en la parte fetal.²⁸⁻³¹ En este ámbito nuestro estudio trata de identificar a nivel categórico de compartimentalización, cuál puede ser el sitio blanco donde se lleva a cabo la síntesis de las citocinas TNF- α e IL-1 β , ya sea que representen la señal que da término a la gestación, o forme parte de los mecanismos desencadenados en el trabajo de parto, activados por otra vía. Nos es claro que el ambiente periférico y fetal representan universos bien definidos al momento de la toma del producto, los cuales responden con precisión la pregunta asignada. Por otro lado, pareciera existir falta de definición en el análisis realizado a partir de la sangre retroplacentaria, debido a la gran cantidad de estirpes celulares locales (amnios, corion, decidua, fibroblastos) y de tránsito (monocitos, macrófagos, linfocitos, granulocitos) capaces de sintetizar

diversas linfocinas, monocinas, interferones, factores de crecimiento, los cuales pueden tener efecto antagónico y/o sinérgico diferente sobre las células productoras de TNF- α e IL-1 β . Sin embargo, es seguro que la concentración final determinada en el plasma de la sangre recolectada en esa región, representa la suma total de eventos acontecidos después del acuerdo molecular al que llegan las células locales y de tránsito. Esto es posible debido a que las citocinas se producen durante la fase de activación de las células, siendo un proceso breve y regulado ya que estas no se almacenan como moléculas preformadas y su síntesis inicia con la aparición *de novo* de los mRNA que las codifican, liberándose al espacio extracelular en forma inmediata a las modificaciones postranscripcionales (glucosilación generalmente) a que haya lugar.^{32,33}

El análisis de la concentración de TNF- α en los tres compartimentos de los grupos estudiados, al ser analizada mediante procedimiento estadístico no mostró diferencia alguna entre los compartimentos intra e intergrupo, sin embargo, es posible observar una tendencia a estar en mayor concentración en el ambiente fetal y retroplacentario, comparada con el valor observado en sangre periférica. Esta tendencia sólo es observada en los grupos de mujeres con embarazos a término con trabajo de parto, y en el grupo que presentó nacimientos pretérmino. La concentración de esta citocina en los compartimentos retroplacentarios y fetal, manifiesta los valores de mayor dispersión comparados con el que presentan tanto el ambiente retroplacentario de las mujeres con embarazos a término sin trabajo de parto, y con el que se presenta en el compar-

timiento materno de los tres grupos. Las tendencias comentadas anteriormente sobre la concentración de TNF- α . En primera instancia pueden explicar la falta de soporte estadístico para identificar diferencias significativas al comparar los grupos; lo que en el ámbito biológico se interpreta como un mayor grado de activación, por parte de las células involucradas en la producción de esta citocina en el ambiente fetal y retroplacentario. Por otro lado, las concentraciones de IL-1 β observadas en los compartimentos analizados de los grupos estudiados, no mostraron diferencias estadísticas significativas al compararse entre ellas, sin embargo, al igual que con TNF- α es posible observar cierta tendencia a estar aumentada en el grupo de mujeres con trabajo de parto a término y pretérmino, pero solamente en el compartimento retroplacentario, ya que los valores en plasma fetal y materno así como el retroplacentario del grupo a término sin trabajo de parto, muestran valores muy parecidos con desviaciones estándar muy pequeñas. Estos resultados confirman y están acordes con datos previos en el que se ha determinado la concentración de ambas citocinas, en el líquido amniótico de mujeres con embarazos a término con y sin trabajo de parto, observando una mayor concentración estadísticamente significativa en el líquido amniótico de mujeres con trabajo de parto, tanto de TNF- α como de IL-1 β . Los estudios antes citados pudieron documentar una mayor concentración de ambas citocinas, en el líquido amniótico de las mujeres que presentaron parto pretérmino y en los

casos donde se identifica infección intraamniótica, los valores alcanzan órdenes de magnitud por arriba de los obtenidos en los grupos de mujeres sin infección.^{13,16,24}

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren a los compartimentos fetal y retroplacentario como el sitio donde da inicio la síntesis de las citocinas TNF- α e IL-1 β , una vez que el trabajo de parto es manifiesto, los cuales apoyan la hipótesis que descarta al compartimento materno como el sitio marcador para que el evento dé inicio. En este aspecto, a partir de las tendencias de aumento de TNF- α en el compartimento fetal y retroplacentario, en los grupos de mujeres con trabajo de parto (a término y pretérmino), así como de IL-1 β exclusivamente en el ambiente retroplacentario en los mismos grupos, es posible postular un gradiente de TNF- α que identificarían al producto, como el compartimento que dirige la producción de esta citocina inflamatoria. La concentración de TNF- α observada en la parte retroplacentaria, puede reflejar la síntesis inicial llevada a cabo en el ámbito fetal, la que al equilibrar su concentración en la interface madre-feto-placentaria sumada a la producción local de TNF- α , induce la cascada de citocinas inflamatorias en diversas células de este compartimento, lo que en nuestro estudio representa la tendencia a existir en mayor cantidad IL-1 β en el compartimento retroplacentario, pues se sabe que el TNF- α es una de las moléculas naturales más potentes identificadas, en la inducción de síntesis de IL-1 β , IL-6, IL-8 por diversas células inmunológicas y no inmu-

nológicas.³⁴ Al respecto se podría argumentar que la concentración de TNF- α fetal, podría generarse a partir del ámbito retroplacentario bajo el planteamiento antes comentado, sin embargo, si así fuera el caso deberíamos observar valores similares de IL-1 β en la parte fetal y retroplacentaria, lo cual no es observado. Por otro lado, hemos podido identificar significativamente un número mayor de linfocitos T activados (CD3+/HLA-DR+), en el compartimento fetal y retroplacentario de muestras provenientes de mujeres con trabajo de parto pretérmino, comparado con el número de células identificadas en los mismos compartimentos en muestras provenientes de mujeres con embarazos a término sin trabajo de parto.³⁵ La identificación de marcadores de activación superficiales en linfocitos, manifiesta que estos han sido reclutados para iniciar funciones efectoras dentro de la que destacan proliferación, actividad citotóxica, comunicación celular, migración, síntesis de citocinas, etc.³⁶ Los datos comentados reafirman la hipótesis planteada, en el sentido que el producto puede participar de manera activa en el inicio de los eventos involucrados en el trabajo de parto, utilizando mecanismos del sistema inmunológico pues ello le asegura gran plasticidad en la regulación del evento. De ser confirmada la participación activa del producto en el término de la gestación ya sea normal o patológica, la visión pasiva actual de muchos mecanismos inmunológicos en la etapa intrauterina y en los primeros meses de vida del nuevo ser, tendrá que ser replanteada.

■ REFERENCIAS

- Rowosky JA. *The Economics of preterm delivery*. Prenat Neonat Med 1998; 3: 16-20.
- Main DM. Preterm Labor Int J Gyn Obst 1995; 50: 303-13.
- Alexander GR. *Preterm birth etiology, mechanisms and prevention*. Prenat Neonat Med 1998; 3: 3-9.
- Romero R, Gómez R, Mazor M. *The Preterm Labor Syndrom*. In Murdo G. Elder editor. Preterm Labor. USA Churchill Livingstone, 1997: 29-49.
- Hall MH, Danielian P, Lamont RF. *The importance of preterm birth*. In Murdo G. Elder editor. Preterm Labor, USA Churchill Livingstone Inc, 1997: 1-28.
- Lumley J. *The association between prior spontaneous abortion, prior induced abortion and preterm birth in first singleton births*. Prenat Neonat Med 1998; 3: 21-4.
- Schetter CD. *Maternal stress and preterm delivery*. Prenat Neonat Med 1998; 3: 39-42.
- Geary M, Lamont F. *Prediction of Preterm Birth*. In Murdo G. Elder editor. Preterm Labor USA Churchill Livingstone Inc. 1997: 51-63.
- Cassey ML, MacDonald PC. *Initiation of labor in women*. In G. Huszar editor. The physiology and biochemistry of the uterus in Pregnancy and Labor. Florida, USA CRP Press, Inc. 1984: 155-60.
- Casey ML, MacDonald PC. *Human parturition: Distinction Between the initiation of parturition and the onset of labor*. Sem Reprod Endoc 1993; 11: 3(Aug): 272-84.
- Mitchell MD, Branch W, Lundin-Shiller S, Romero R. *Immunologic aspects of preterm labor*. Sem Perinat 1991; 15:3(Jun): 210-24.
- Mitchell MD, Trautman MS, Dudley DJ. *Cytokine network in the placenta*. Placenta 1993; 14: 249-75.
- Romero R, Mazor M, Sepúlveda W, Avila C, William J. *Tumor necrosis factor in preterm and term labor*. Am J Obstet Gynecol 1992; 166(5): 1576-87.
- Laham N, Brennecke SP, Bendtzen K and Rice GE. *Tumor necrosis factor during human pregnancy and labour: maternal plasma and amniotic fluid concentrations and release from intrauterine tissue*. Eur J Endo 1994; 131: 607-14.
- Hunt JS, Hua-Lin-Chen, Miller L. *Tumoral necrosis factor: Pivotal components of pregnancy*. Biol Rep 1996; 54: 554-62.
- Halgunset J, Johnsen H, Kjolesdal AM, Qvgstad E. *Cytokine levels in amniotic fluid and inflammatory changes in the placenta from normal delivery at term*. Eur J Obstet Gynecol Rep Biol 1994; 56: 153-60.
- Baggia S, Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ. *Interleukin 1-β intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor, Prostaglandin production and preterm contractions in pregnant Rhesus monkeys*. J Soc Gynecol Invest 1996; 3: 3(May): 121-26.
- Gravett MG, Miles SS, Novy J. *An nonhuman primate model for chorioamnionitis and preterm labor*. Sem Reprod Endoc 1994; 12: (4): 246-62.
- Subdirección General Médica. *Valoración de la edad gestacional postnatal. Método de Capurro*. En Samuel Karchmer K, Francisco Cabral Castañeda, Francisco Ochoa Ibargüenogitia editores. Normas y procedimientos de Neonatología del Instituto Nacional de Perinatología. México, D.F. Marketing y Publicidad de México, 1994; P.N. 1.8-1.
- Baumann H, J. Gauldine. *The acute phase response*. Immunol Today 1994; 15: 74-80.
- Ader R, Cohen N, Faelten D. *Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system*. Lancet 1995; 345: Jan(14): 99-103.
- Reichlin S. *Neuroendocrine-immune interactions*. New Engl J Med 1993; 329(17): 1246-53.
- Buckley AR, Buckey DJ, Leff MA, Hoover DS, Magnuson N. *Rapid induction of pim-1 expression by prolactin and Interleukin-2 in rat Nb2 Lymphoma cells*. Endoc 1995; 136(12): 5262-58.
- Kelly RW. *Inflammatory mediators and parturition*. J Reprod Fer 1996; 8: 89-96.
- Opsjon SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G. *Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1993; 169(2): 397-404.
- Gómez R, Romero R, Edwin SS, David C. *Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection*. Inf Dis Clin 1997; 11(1): 135-76.
- Dudley DJ, Collmer D, Murray D, Trautman MS. *Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissue: implications of term and preterm labor*. J Soc Gynecol Invest 1996; 3(6): 328-35.
- Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Hyun B, Mazor M. *A feral systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition*. Am J Obstet Gynecol 1998; 179(1): 186-93.
- Romero R, Gomez R, Ghezzi F, Hyun B, Mazor M. *The fetal inflammatory response syndrome*. Am J Obstet Gynecol 1998; 179(1): 194-202.
- Romero R, Brody DT, Oyarzum E, Mazor M, King Y. *Infection and labor*. Am J Obstet Gynecol 1989; 160(5): 1117-24.
- Reisember K, Egater Ch, Knofler M, Schiebel I. *Cytokine and prostaglandin production by amnion cells in response to the addition of different bacteria*. Am J Obstet Gynecol 1998; 178(1): 50-3.
- Powrie F, Coffman R. *Cytokine regulation of T cell function potential for Therapeutic intervention*. Immunology Today 1993; 127: 5-24.
- Debates R, Savelkoul H. *Cytokine antagonists and their potential therapeutic use*. Immunology Today 1994; 15: 455-58.
- Abbas AK, Lichtmann HA, Pober JA. *Inmunología celular y molecular 2a. Edición de: Interamericana-McGraw-Hill, España 1998; 285-90.*
- Tenorio-Ramos J, Vadillo-Ortega F, Hernández-Guerrero C, Ahued-Ahued JR, Quesnel-García C, Neri-Méndez C, Herrerías-Canedo T. *Balance de la respuesta inmune TH1/TH2 en la interfase materno-fetal de pacientes con embarazo normal y pretérmino. Resultados preliminares*. Ginec Obst Mex 1999; 67: 207.
- Swain SL. *The activation and differentiation of T cells*. The immunologist 1995; 3(5): 20-5.

Evaluación comparativa de la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas entre el osteodensitómetro de rayos X y de ultrasonido

■ Dr. Victoriano Llaca Rodríguez*, Dr. Rafael Aguilera Pérez**, Dr. Roberto Ahued Ahued*** Dra. Fernanda Rio de la Loza**, Enf. Laura J. Mendoza Torres****, Dra. Irma Coria Soto*****, M. Marcela Zambrana Castañeda*****

■ RESUMEN

Con el cambio en el estilo de vida de la mujer se ha incrementado el tabaquismo, el consumo de bebidas con cafeína y el sedentarismo, por lo cual se intensifican los factores de riesgo y se favorece la descalcificación, constituyendo un problema de salud pública por el aumento en la incidencia de fracturas osteoporóticas conforme avanza la edad, sobre todo en la mujer posmenopáusica, la cual lleva a una mayor morbilidad secundaria a esta entidad, siendo una causa importante de discapacidad física, afectando en forma directa el bienestar psicoemocional de la mujer. Con el desarrollo de la tecnología, cada vez se cuenta con equipos de diagnóstico más sensibles y específicos para detectar la descalcificación en estas mujeres; se utilizaron dos métodos de osteodensitometría, uno a través de rayos X, y otro a través de ultrasonido en 138 mujeres en la etapa de la posmenopausia con un promedio de índice de masa corporal de 29. Se compararon ambos resultados de densidad ósea, puntuación de T,

con osteopenia y osteoporosis. Se realizó doble densitometría a las 138 pacientes de columna lumbar con equipo DEXA, y de calcáneo con equipo DTU-one, por el mismo técnico, calculando la diferencia del puntaje de T en el doble estudio.

(Llaca R, V y col: *Evaluación comparativa de la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas entre el osteodensitómetro de rayos X y el de ultrasonido. Ginec Obst Mex 2000; 68:113*).

■ SUMMARY

With lifestyle changes in women, tabaquism and use of beverages with caffeine, and sedentarism increasing, so the risk factors for decalcification, increase; which is a public health problem by the higher incidence of osteoporotic fractures, as the age advances, specially in the post-menopausal woman, which means a greater secondary morbi-mortality; an important cause of physical disability, which directly affects psychoemotional wellbeing in women. In this study two methods of osteodensitometry, were used; one of x

ray, and other with ultrasound in 138 women during postmenopause with an average index of corporal mass of 29. Both results were compared of osseum density, T measurement with osteopenia and osteoporosis. Doubledensitometry, was done in the 138 patients of lumbar spine with DEXA equipment, and of calcaneum with DTU-one equipment, by the same technician, finding the difference of T punctuation in this double study.

(Llaca R, V y col: *Comparative evaluation of mineral bone density in Mexican women with osteodensimeter of X ray and ultrasound. Ginec Obst Mex 2000; 68:113*).

De los principales factores de riesgo para fractura es la resistencia esquelética baja ya que la masa ósea en total corresponde hasta 85% de la resistencia esquelética. Desde hace tiempo la medida de la masa ósea por método no invasivo ha representado un papel importante en el diagnóstico y la prevención de la osteoporosis.

La utilización de marcadores bioquímicos de remodelado óseo y

Instituto Nacional de Perinatología

* Jefe del Departamento de Climaterio

** Médico adscrito al Departamento de Climaterio

*** Director General

**** Enfermera adscrita al Departamento de Climaterio

***** Jefe del Departamento de Análisis y Estadística

***** Adscrita al Departamento de Análisis y Estadística

Trabajo premiado con el Primer Lugar en *Investigación Clínica*; 50° Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, Méx. D.F.

el estudio de los factores de riesgo permite reconocer a las poblaciones de menor y mayor riesgo en la prevalencia de osteoporosis, sin embargo, ninguno de estos estudios sustituye la medición formal de la masa ósea de manera individualizada; el realizarlo de esta manera permite predecir el riesgo de fractura en zonas de interés para el clínico, tomándose en cuenta los factores de riesgo y el estilo de vida de la paciente.

A lo largo de los años se han desarrollado diversas formas para medir la calidad y cantidad de masa ósea, entre ellas cabe destacar a los patrones morfológicos de radiografías simples de esqueleto, análisis semicuantitativos de rayos X de columna y cadera, radiografía metacarpiana y medición de la densidad mineral ósea en segmentos definidos a través de rayos X y a través de ultrasonido. La correlación de la interpretación de estas técnicas ha sido en general baja.

En cuanto a la osteodensitometría hoy en día se utiliza principalmente mediante tomografía computarizada cuantitativa o rayos X con doble fotón de baja energía (DEXA) como lo utilizado en el Instituto Nacional de Perinatología. Estos métodos requieren equipos de computación y programas especializados en donde se realizan análisis morfométricos cuantitativos de los cuerpos vertebrales en proyección lateral para diagnóstico de fracturas por compresión. Se analizan distintas áreas del cuerpo como pueden ser los cuerpos vertebrales, cuerpo entero, cadera, antebrazo en proyecciones lateral como ya mencionamos y en anteroposterior. El resultado se obtiene en gramos por centímetro cuadrado de la

imagen obtenida. En relación a la densitometría fotónica doble, precisa un menor tiempo, no tiene el riesgo de disminución inadvertida de la actividad isotópica de la fuente, su software permite lecturas totales o parciales de cualquier parte del esqueleto y presenta una elevada precisión, 0.5%. Sin embargo, tiene limitaciones en cuanto a la presencia de osteofitos y calcificaciones extraóseas las cuales no las discrimina del hueso cortical o trabecular. Los resultados obtenidos puede expresarse de dos maneras. En forma de "T-Score", valor que representa el grado de desviación que tiene la densidad ósea de la paciente problema, respecto del pico de masa ósea alcanzado por la población adulta joven. Los resultados expresados en forma de "Z-score" representan el grado de desviación de los valores de densidad mineral ósea obtenidos en nuestro paciente problema, respecto de los de la población de referencia de la misma edad y características. La Z-Score no permite, entre otras cosas, conocer si el ritmo de pérdida ósea observado en varios controles sucesivos se ajusta a la disminución fisiológica correspondiente a la edad o, por el contrario, responde a una situación patológica. En definitiva, esta información es la que nos ayuda a tomar decisiones desde el punto de vista terapéutico.

La técnica de ultrasonido se basa en que la atenuación o la transmisión de un haz de ultrasonido está en relación con la densidad del hueso que atraviesa. De esta manera, pueden emplearse como parámetros de referencia la medición de la atenuación de los ultrasonidos mediante unidades BUS, expresa-

das en dB/MHz y de SOS, velocidad de transmisión del sonido expresado en m/seg. Para ello, se emplea un emisor-receptor a cada lado del hueso problema, siendo el más frecuentemente estudiado el calcáneo. Esta técnica presenta como ventaja más importante el estar libre de radiación y su principal inconveniente es que no permite el estudio de las partes que se afectan con más frecuencia en el climaterio como vértebras y fémur. Por otra parte, el calcáneo es un hueso que puede experimentar cambios trabeculares en función de otros parámetros como peso y actividad del individuo, que poco a nada tienen que ver con la osteoporosis.

Desde el punto de vista clínico y práctico, el aspecto más importante a tener en cuenta para el diagnóstico de la osteoporosis y para la definición del umbral de fractura y el de algunos grupos de riesgo, perdedoras rápidas, es sin duda, el conocimiento de los valores normales de densidad ósea de la población que se está estudiando. En estudios realizados por Pérez Cano y col. en España en 185 pacientes en donde se utilizó equipo DEXA, demostró cómo el pico de masa ósea es mayor en el varón que en la mujer y cómo en esta última se produce una pérdida ósea de 25% entre los 35 y los 65 años, correspondiendo 60% del total de la producida durante la década posterior a la instauración de la época del climaterio.

Objetivo del estudio

Comparar el valor de T de las densitometrías por rayos X y por ultrasonido realizadas por el mismo técnico en una muestra de 138 pacientes en el Instituto Nacional de Perinatología, para obtener el

valor real de las mismas en la mujer mexicana.

Justificación

En el Departamento de climaterio del Instituto Nacional de Perinatología se cuenta con dos tipos de densitómetros para el estudio de la paciente climatérica. Uno de ellos es el Norland XR-26 de tipo DEXA, cuyo funcionamiento es a base de radiación por rayos X comparando su valor de T respecto del pico de masa ósea alcanzado por la población joven en pacientes mexicanas; el otro es el DTU-one cuyo funcionamiento es a través de ultrasonido aplicado al calcáneo comparando su valor de T respecto del pico de masa ósea alcanzado por la población joven en pacientes europeas. Considerando la diferencia de valores para la osteodensitometría con mujeres de raza distinta que trae consigo alimentación y culturas diferentes, nos parece relevante tener determinaciones en nuestras mujeres con todos los valores propios de ellas para conocer las cifras reales en la medición de hueso.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 138 pacientes posmenopáusicas de origen mexicano con edad promedio de 53 años, con al menos dos años posteriores a la fecha de última menstruación, clínicamente sanas y sin antecedente previo de fracturas. Todas las pacientes se encontraban en tratamiento de reemplazo en alguna de sus alternativas, además de la ingesta de carbonato de calcio de 1.5 g al día. Todos los sujetos fueron incluidos en el estudio posterior a un consentimiento informado. Se utilizaron para la realización de las densitometrías un equipo tipo DEXA de rayos X y un equipo

DTU-one para ultrasonido de calcáneo.

Las 138 pacientes fueron divididas en dos grupos pareados. El primer grupo de ($n = 138$) fue sometido a osteodensitometría por rayos X analizando la región lumbar y obteniendo el valor de (t) con respecto a la población joven del mismo origen étnico, posteriormente se sometió a las mismas pacientes ($n = 138$) a osteodensitometría con equipo de ultrasonido obteniéndose el valor de (t) con respecto a la población joven de origen caucásico.

Se compararon ambos resultados, utilizándose como estándar de oro el valor de la densitometría de rayos X, agrupándose a las pacientes de acuerdo a lo reconocido universalmente para su clasificación con desviaciones estándar: pacientes normales de $+1\text{DE}$ a -0.99DE ; osteopenia de -1.0 DE a -2.49DE ; osteoporosis de $x < -2.5\text{ DE}$.

Para la comparación de ambos grupos se utilizaron análisis estadísticos en un sentido para todos y pareado con prueba de t de Student y Chi cuadrada. El nivel de significancia para todas las pruebas estadísticas fue de 0.914. La correlación de Pearson fue empleada para estudiar la interrelación entre los distintos parámetros utilizados y se recurrió al método de regresión estadística para el valor de (t) sobre el valor de (t) obtenida por ultrasonido.

■ RESULTADOS

En el grupo 1 pacientes valoradas con osteodensitometrías (DMO) de rayos X se encontró: Normales 38.4%, con osteopenia 50.7% y con osteoporosis 10.9%.

El grupo 2 valorado con ultrasonido calcáneo mostró los siguientes valores: Normales 44.2%, con osteopenia 38.4% y con osteoporosis 17.4%.

Al comparar los valores de ambos grupos con los análisis estadísticos ya mencionados, se encontró una diferencia promedio de -0.0072 con una desviación estándar de $.788$ con un índice de error de 0.067 con una correlación de $.362$ y una (p) de 0.000 (significativa). Se obtuvieron 137 grados de libertad con un nivel de significancia total de .914.

De acuerdo a la Tabla I del total de las pacientes diagnosticadas como normales por osteodensitometría de rayos X, únicamente 60.4% fueron diagnosticadas por osteodensitometría por ultrasonido de calcáneo. De las pacientes con diagnóstico de osteopenia por DMO por rayos X, únicamente 41.4% fueron diagnosticadas por DMO por ultrasonido. Por otro lado, del total de las pacientes diagnosticadas como osteoporosis, únicamente 46.7% fueron diagnosticadas como tal con el método de DMO por ultrasonido.

Al realizar el método de regresión estadística se observó en la DMO por ultrasonido el diagnóstico de un porcentaje de pacientes normales 63.4%, por lo cual se obtiene una especificidad demasiado baja, casi de 50 por ciento en comparación con DMO con rayos X, para un aparato que intenta ser un método de pesquisa o tamizaje. Por otro lado se encontró una sensibilidad muy pobre al sobre diagnosticar casos patológicos de osteopenia y osteoporosis en 93.3% cuando el total diagnosticado por rayos X fue de 71.6%.

■ COMENTARIO

Ante la diferencia de valores obtenidos en la práctica de la densitometría en pacientes que asisten al Departamento de Climaterio de nuestra institución ya que tenemos

OSTEOMETER MediTech A/S

DTU-one

****Instituto Nacional de Perinatología****

DTU-one

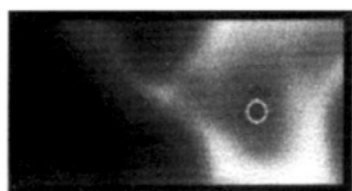
Calculation Report

17/09/1999, 13:19

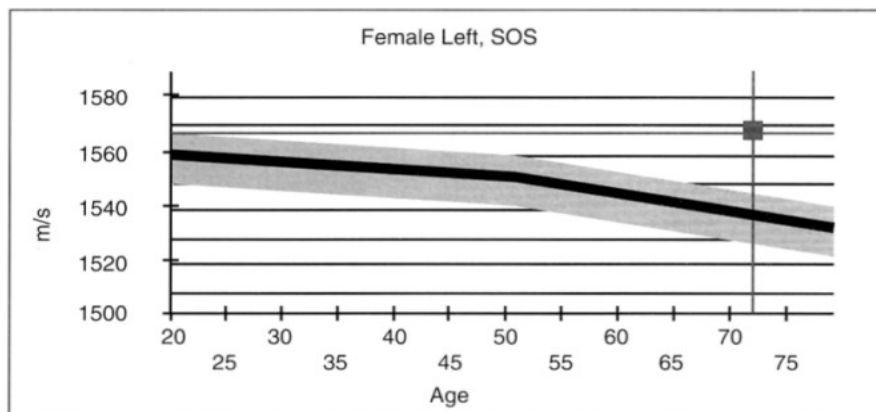
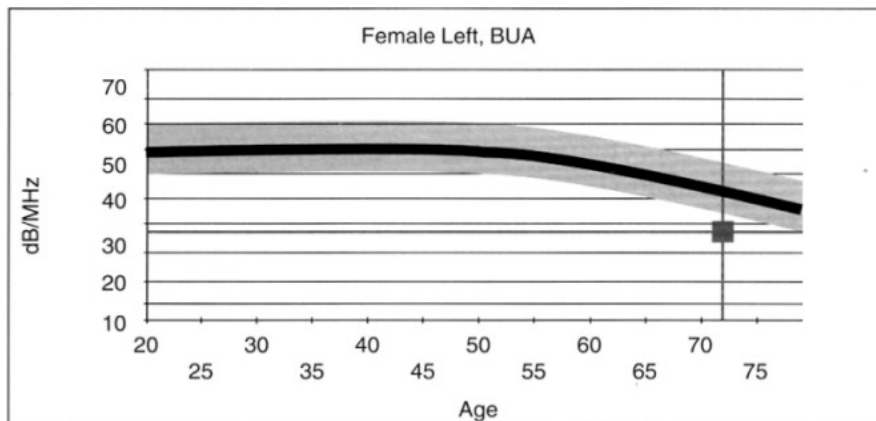
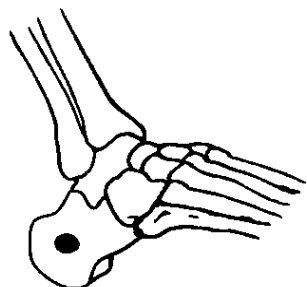
S/N: 0037

AMP - Measured: 14/07/1999

Image not for diagnostic use



Position (x,y) = (72,101)
ROI radius = 4 eq d = 4.8mm
Automatic calculation



Amplitude	13.170	T-Score SD	Young Mean%	Z-Score SD	Age-Matched%
BUA	32.341 dB/MHz	-3.06	62.20	-1.42	78.01
SOS	1567.144 m/s	0.92	100.60	3.10	102.06

Patient Data:

First name:

Code: 0014

Address:

Last name:

Site: Left

Postal Code:

Date of Birth: 03/11/1926

City: México

Sex: Female

Current Age: 72

Menopausal Age: 49

Year since Menopause (YSM): 23

Height: 1.46 m

Weight: 47.0 kg

Doctors comments:

Ejemplo No. 1

El valor de (t) coincide con DMO por Rx

Depto. de Climaterio y Osteoporosis INPer

Nombre:

ID 2789

Edad 72

Sexo Mujer

Origen: Mexicana

Altura 1.46

Peso 47

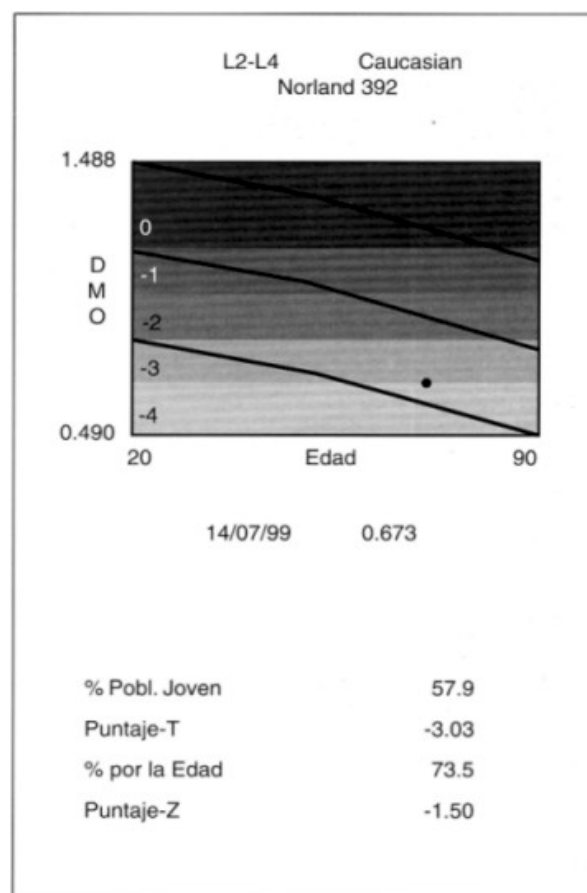
L H



Imagen no para propósito diagnóstico.

Colum. AP 14/07/99

Sequencia 1



Posición Manual

	DMO g/cm ²	CMO g	Longitud cm
L2	0.689	9.629	3.15
L3	0.699	10.225	3.15
L4	0.637	10.375	3.30
L2-L4	0.673	30.229	9.60

Estdr. CVs para L2-L4 DMO: 1.0 CMO: 1.5 Vea Guía para otros CVs.
1.5 x 1.5 mm, 60.0 mm/s, 12.00 cm Rev. 2.3.0/1.2.1 Calib. 14/07/99

COMENTARIOS

OSTEOMETER MediTech A/S

DTU-one

****Instituto Nacional de Perinatología****

DTU-one

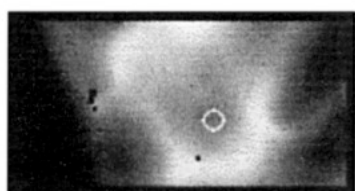
Calculation Report

12/08/1999, 15:54

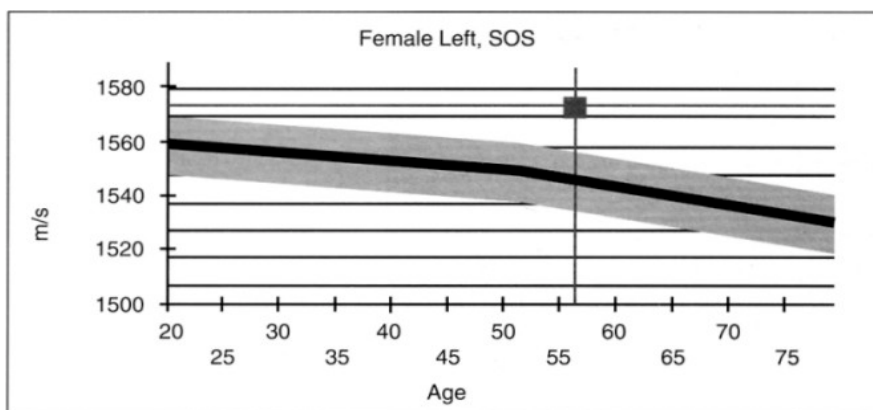
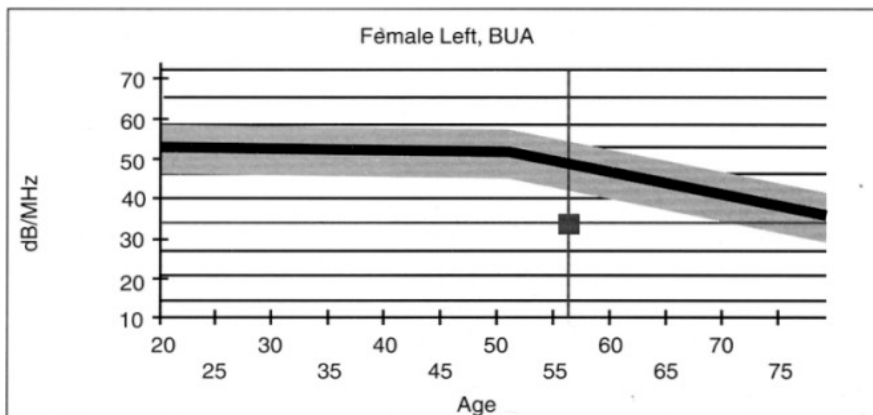
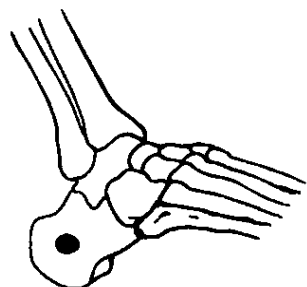
S/N: 0037

AMP - Measured: 12/07/1999

Image not for diagnostic use



Position (x,y) = (59,103)
ROI radius = 4 eq d = 4.8mm
Automatic calculation



Amplitude	3.271	T-Score SD	Young Mean%	Z-Score SD	Age-Matched%
BUA	33.420 dB/MHz	-2.89	64.28	-2.53	67.30
SOS	1573.932 m/s	1.59	101.03	2.82	101.86

Patient Data:

First name:
Last name:
Date of Birth: 07/01/1943
Sex: Female
Current Age: 56
Menopausal Age: 51
Year since Menopause (YSM): 5
Height: 1.62 m
Weight: 57.0 kg

Code: 006
Site: Left

Address:
Postal Code:
City: México

Doctors comments:

se le realizó densitometría con qr1500
Ejemplo No. 2

El valor de (t) por US no coincide con valor de (t) por DMO por Rx

Depto. de Climaterio y Osteoporosis INPer

Nombre:

ID 2057

Edad 56

Sexo Mujer

Origen: Mexicana

Altura 1.62

Peso 57.7

L H

Colum. AP 12/07/99 Secuencia 1

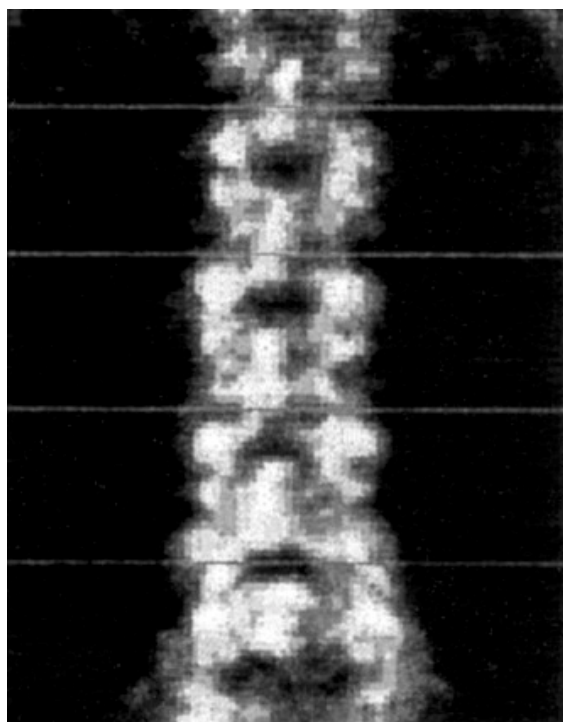
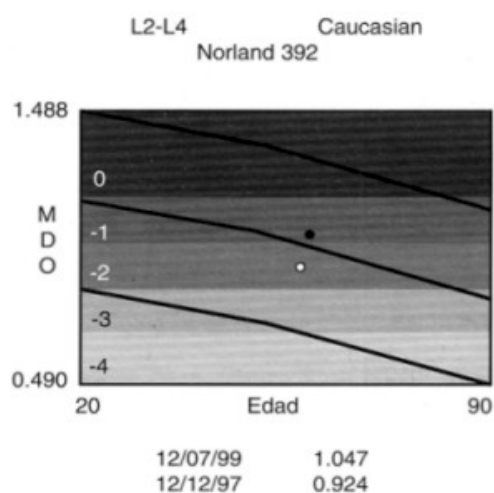


Imagen no para propósito diagnóstico.



% Pobl. Joven	90.0
Puntaje-T	-0.72
% por la Edad	103.5
Puntaje-Z	-0.22

Cambio	%	%/Año
Corto	13.4	8.5
Largo	13.4	8.5

Posición Manual

	DMO g/cm ²	CMO g	Longitud cm
L2	0.998	13.205	3.30
L3	1.046	15.297	3.45
L4	1.090	17.115	3.45
L2-L4	1.047	45.617	10.20

Estdr. CVs para L2-L4 DMO: 1.0 CMO: 1.5 Vea Guía para otros CVs.
1.5 x 1.5 mm, 60.0 mm/s, 12.00 cm Rev. 2.3.0/1.2.1 Calib. 12/07/99

COMENTARIOS

Tabla I

Relación de valores de t de rayos X en comparación con valores de t de ultrasonido

	(t) Rx Osteoporosis	(t) Rx Osteopenia	(t) Rx Normales	Total
(t) US Osteoporosis	7 46.70%	13 18.60%	4 7.50%	24 17.40%
(t) US Osteopenia	7 46.70%	29 41.40%	17 32.10%	53 38.40%
(t) US Normales	1 6.70%	28 40.0%	32 60.40%	61 44.20%
Totales	15 10.90%	70 50.70%	53 38.40%	138 100%

la oportunidad de contar con un densitómetro que funciona con la metodología de rayos X que es el

Norland XR-26 de tipo DEXA y el que funciona por ultrasonido aplicado al calcáneo que es el DTU-one

tuvimos la inquietud de comparar los resultados obtenidos por las distintas metodologías en la misma paciente.

Lo anterior nos permitió conocer en una muestra de 138 pacientes objetivamente diferencias existentes con los distintos métodos; el que funciona con una fuente de rayos X nos permitió obtener mayor especificidad y sensibilidad altamente resolutive, ello nos dará oportunidad de lograr el objetivo trazado en el inicio de esta investigación, encontrar valores específicos en la mujer mexicana en lo que se refiere a la pérdida ósea durante la época del climaterio.

■ REFERENCIAS

1. Heany RP. *The role of nutrition in prevention and management of osteoporosis*. Clin Obstet Gynecol 1987; 50: 833-46.
2. Riggs BL, Melton LJ. *Involutional osteoporosis*. N Eng J Med 1986; 314: 1676-84.
3. Delmas PD y cols. *Effects of treatment on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women*. N Engl J Med 1997; 337: 1641-7.
4. Dueñas JL. *Osteoporosis climática: Prevención y tratamiento*. En: Fundamentos básicos y clínicos en menopausia. Tomo 1. ed: Cano A 1996: 135-51.
5. Grupo de Trabajo en Osteoporosis (GTO). *Estudio de la densidad ósea en la población española*. Ed. Pharma Consult, 1992.
6. SH Prins et al. *The role of quantitative ultrasound in the assessment of bone: A review*. Clinical Physiology 1998; 18, 1: 3-17.
7. Jorgensen HL et al. *Improvement reproducibility of broadband ultrasound attenuation (BUA) of the os calcis by using a specific region of interest (ROI)*. Bone 1997; 21: 109-12.
8. Gonelli S et al. *Ultrasound parameters in osteoporotic patients treated with salmon calcitonin: A longitudinal study*. Osteoporosis Int 1996; 6: 303-7.
9. Jones PRM et al. *Influence of brisk walking on the broadband ultrasonic attenuation of the calcaneus in previously sedentary women aged 30-61 years*. Calcif Tissue Int 1991; 49: 112-5.
10. Graafmans WC et al. *Ultrasound measurements in the calcaneus, precision and its relation with bone mineral density of the heel, hip, and lumbar spine*. Bone 1996; 19: 97-100.
11. Roux P et al. *Broadband ultrasound attenuation imaging, a new imaging method in osteoporosis*. J Bone Miner Res 1996; 11: 1112-8.
12. Ross P et al. *Predicting vertebral deformity using bone densitometry at various skeletal sites and calcaneous ultrasound*. Bone 1995; 16: 325-32.
13. Consensus Development Statement. *Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis?* Osteoporosis Int 1997; 7: 1-6.
14. Marshall D et al. *Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures*. BMJ 1996; 312: 1254-9.
15. Hans D et al. *Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women, the EPIDOS prospective study*. Lancet 1996; 348: 511-4.

Apoptosis en trofoblasto de pacientes con aborto espontáneo recurrente de causa no identificada

■ Dr. Felipe Vadillo Ortega¹, Dr. Marco Antonio Avila Vergara², Dr. César Hernández Guerrero¹, Dr. Fabián Arechavaleta Velasco¹, Dr. Jorge Beltrán Montoya¹

■ RESUMEN

El aborto espontáneo recurrente de causa no identificada o idiopático es un importante problema de salud reproductiva. En este trabajo se ha iniciado el estudio de uno de los mecanismos que podrían mediar en esta patología del embarazo humano. La hipótesis general que se propone, es que en los casos de pacientes con aborto espontáneo recurrente de causa no identificada (AER), existen fenómenos en el entorno materno/feto/placentario que se manifiestan en daño en la funcionalidad y/o vitalidad del tejido placentario. La hipótesis planteada fue consistente con el hallazgo de activación masiva de muerte celular programada en todos los casos con AER estudiados en este trabajo.

(Vadillo O., F. y col: *Apoptosis en trofoblasto de pacientes con aborto espontáneo recurrente de causa no identificada*. Ginec Obst Mex 2000; 68:122).

■ SUMMARY

Recurrent spontaneous abortion of unidentified cause or idiopathic is an important problem of reproduction health. In this study, the study has been started of one of the mechanisms that could act in the pathology of human pregnancy. The general hypothesis proposed, is that in the case of patients with

recurrent spontaneous abortion of non identified cause (RSA) there are phenomena in the materno/fetal/placental means that manifest themselves in harm to the functionality and/or vitality of placental tissue. The hypothesis was consistent with the finding of massive activation of cellular death in all the cases with RSA studied in this work.

(Vadillo O, F y col: *Apoptosis in trophoblast of patients with recurrent spontaneous abortion of non identified cause*. Ginec Obst Mex 2000; 68:122).

El aborto es la complicación más frecuente del embarazo,¹ y cuando se presenta de modo recurrente – dos o más en forma consecutiva – representa, además de un problema de infertilidad, una fuente de desestabilidad emocional para las parejas que viven el problema.²⁻⁴ Médicamente el aborto de repetición representa un reto para el ginecólogo que enfrenta el problema, ya que en más de la mitad de los casos a pesar de agotar los recursos diagnósticos clínicos y de laboratorio propuestos por los grupos de consenso,⁵⁻⁸ no es posible establecer la causa,^{2,4,9-11} denominándose aborto espontáneo recurrente de causa no identificada (AERi).^{2,5,12-15} Por lo que las posibilidades de intervenir de manera eficaz en la historia natural de la

enfermedad, hasta el momento son mínimas. Además de incrementarse el riesgo de un nuevo aborto conforme se repite el evento.¹⁶⁻¹⁹ Durante los últimos años, entre los estudios sobre los mecanismos que condicionan el aborto recurrente, destaca la existencia de un balance funcional de citocinas producidas en la interfase fetoplacentaria-madre.²⁰⁻²⁴ Así, los datos provenientes de modelos animales demuestran el papel abortogénico de algunas citocinas. Chaouat G. y cols.²⁵ examinaron el efecto de inyectar varias citocinas y observaron que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ), y la IL-2 incrementan la proporción de reabsorción fetal en los cruzamientos de ratones propensos al aborto de la cepa CBA/J x DBA/2 y en ratones no susceptibles de la cepa CBA/J x BALB/c y C3H x DBA/2. El efecto fue dependiente de la dosis de TNF- α y de la edad gestacional; en cambio citocinas de la familia CSF (IL-3 y GM-CSF) produjeron el efecto contrario en cepas de ratones propensos al aborto. Clark DA et al. y Ark PC et al.²⁶⁻²⁸ han demostrado que el éxito o falla en el desarrollo del embrión implantado es determinado por un balance entre las citocinas proinflamatorias tales como: factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2),

Subdirección de Investigación Biomédica, Instituto Nacional de Perinatología¹ y Hospital Regional No. 1, IMSS, Culiacán, Sinaloa². Trabajo premiado con el Segundo Lugar en Investigación Clínica; 50º Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, Méx., D.F.

interleucina-1 (IL-1) y el interferón-gamma (IFN- γ) por una parte, y por otra, citocinas que contrarrestan a las primeras, tales como interleucina 10 (IL-10) y factor supresor de factor transformante de crecimiento- β 2 (TGF- β 2). Destaca el efecto sinérgico de las citocinas proinflamatorias en la génesis del aborto, a través de la inducción de apoptosis o necrosis en el trofoblasto.^{26,29,30} Las observaciones en humanos indican la existencia de una red funcional de citocinas en la interfase fetoplacentaria y materna, que puede regular el desarrollo del embarazo favorablemente o desfavorablemente.^{31,32} Así, los estudios de García-Lloret y cols.,³³ demuestran que los efectos de CSF-1 y GM-CSF citocinas linfopoyéticas, están implicados en el desarrollo placentario, ya que estimulan el desarrollo del trofoblasto y concomitantemente con esta diferenciación morfológica, ejercen un mecanismo de regulación positiva "upregulation" en la producción de las hormonas placentarias somatomatotropina y gonadotropina coriónica, mediado a través de IL-1 y TNF- α . El efecto de TNF- α en el desarrollo del citotrofoblasto depende del tiempo de exposición y dosis. Yui y cols.,³⁰ demostraron la citotoxicidad directa del TNF- α sobre placentas humanas. En su trabajo analizaron *in vitro* el efecto de TNF- α e IFN- γ sobre los trofoblastos de placentas de embarazos a término y observaron que TNF- α y el IFN- γ incrementaron la proporción de trofoblastos con apoptosis. Sugiriendo que la función de TNF- α e IFN- γ es regular la muerte celular por apoptosis en el citotrofoblasto vellosos. Las repercusiones clínicas de una sobreproducción de esta citocina o desbalance a favor de citocinas proin-

flamatorias, han sido implicados en cursos clínicos desfavorables, como en el caso de choque séptico, malaria, leishmaniasis y lepra.³⁴⁻³⁸ En el embarazo, la producción de TNF- α por la placenta/decidua en respuesta a infecciones microbianas, ha sido implicada en la patogénesis del parto pretérmino. Sugiriendo que esta citocina participa en los mecanismos de desencadenamiento del parto o terminación del embarazo.³⁹ Aunque algunas de estas condiciones clínicas aún son controversiales. En el caso del embarazo, estas observaciones apoyan fuertemente la hipótesis de una relación directa entre apoptosis y TNF- α , como un mecanismo de daño celular al trofoblasto. Por lo que en este estudio se realizaron experimentos para identificar la magnitud del fenómeno de apoptosis y si existe una asociación entre apoptosis y la presencia de TNF- α en el trofoblasto de pacientes con AERi.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital General Regional No. 1, IMSS, Culiacán, Sinaloa y en la Subdirección de Investigación Biomédica del Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F. Se estudiaron 24 pacientes derechohabientes del IMSS, con la aprobación del Comité de Investigación y Ética del Hospital, previa autorización de los pacientes.

Selección de pacientes

Las pacientes se seleccionaron de la consulta externa de Ginecología y Obstetricia y en la unidad de tococirugía al momento del evento obstétrico. Se distribuyeron en tres grupos de estudio, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión:

Grupo I. Ocho pacientes con aborto espontáneo recurrente de causa no identificada (AERi). Con antecedente de pérdida de dos o más embarazos menores de 22 semanas de gestación en forma consecutiva² y haber completado todas las pruebas de escrutinio⁵⁻⁷ con resultados normales. Se excluyeron las pacientes que recibieron progestágenos para inhibir el aborto. Grupo II. Ocho pacientes con embarazo a término, trabajo de parto normal, eutócico y recién nacido vivo sano, se excluyeron a las pacientes con cervicovaginitis, ruptura prematura de membranas y corioamnionitis. Grupo III. Ocho pacientes con embarazo a término y feto vivo, sanas, programada para cesárea iterativa o electiva sin trabajo de parto. Se excluyeron las pacientes con trabajo de parto o que hayan recibido inductores de la madurez pulmonar.

Obtención de las muestras

Las muestras de tejido placentario se obtuvieron al momento del legrado en el caso de los abortos, o en el alumbramiento posterior a la atención del parto o cesárea, en la unidad de tococirugía del HGR No. 1. Se colectó el total del material extraído en el caso de los abortos, para seleccionar el tejido de características corioplacentarias. En el caso de las placentas de los embarazos a término, se seleccionó un gajo de la placenta que incluyera cotiledón y membranas de cualquier segmento de la placenta. La ruptura y fijación de las placentas se realizó dentro de los primeros tres minutos inmediatamente después del alumbramiento. Se excluyeron las pacientes a las cuales en la etapa de recolección de tejido placentario, no fuera suficiente o sufrir daño durante su procesamiento. El tejido

seleccionado se fijó en formol amortiguado en solución salina con pH 7.4 y posteriormente se incluyó en bloques de parafina para hacer los cortes para su examen histológico, histoquímico e hibridación *in situ* en el laboratorio de biología molecular del Departamento de Biología de la Reproducción del INN.

La identificación de apoptosis en el trofoblasto se realizó mediante las técnicas de TUNEL^{40,41} y DAPI.⁴²

Para la técnica de TUNEL, se definió como presencia de apoptosis cuando al observar las laminillas en el microscopio de luz con el objetivo 40x se observó desarrollo de color marrón/sepia asociado al núcleo de las células trofoblásticas.

Para la técnica de DAPI, se consideró apoptosis a la presencia en el trofoblasto de núcleos con apariencia de grumos aglomerados cuando se observaron las preparaciones al microscopio de epifluorescencia con filtro azul y con objetivo de inmersión a 100x.

Para cada una de las dos técnicas utilizadas (TUNEL y DAPI), las muestras de placenta de cada uno de los pacientes de los tres grupos estudiados, se analizaron por triplicado (tres laminillas) y por dos observadores en forma independiente y ciega. En cada laminilla se observaron cinco campos al azar para contar con el número de células positivas y obtener un promedio por cada una.

Para la identificación del mRNA de TNF- α mediante hibridación *in situ*,⁴³ se analizaron muestras de 12 pacientes cuatro de cada grupo de estudio, con sus respectivos controles. Para realizar una evaluación semicuantitativa, se contaron la proporción de gránulos positivos en el trofoblasto, en al menos cinco campos al azar por laminilla obser-

vada, obteniendo un porcentaje de células positivas por cada laminilla. Las observaciones fueron hechas por dos investigadores en forma independiente y cegados respecto al diagnóstico clínico. Un tercer investigador abrió el código y estableció las correlaciones.

■ PROCEDIMIENTOS

Identificación de apoptosis en células trofoblásticas

1. Técnica de TUNEL (TdT-mediated X-dUTP Nick End Labeling). La determinación de la fragmentación del DNA se realizó con el método descrito por Sgonc y cols.^{40,41} utilizando el *kit In situ* Cell Death Detection Kit, POD (Boehringer Mannheim). Cortes de 6 μ m de las placentas preparadas fueron desparafinados por calentamiento a 60°C y tratamiento con xileno. Se rehidrataron en etanol de concentración decreciente y se incubaron con proteinasa K por 30 minutos a 37°C. Para el marcador de los extremos terminales libres 3'OH del DNA genómico con fluorocéina-dUTP, se agregó desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y se incubaron las laminillas 30 minutos a 37°C. La detección de los dUTP se realizó por adición de un anticuerpo antifluorocéina acoplado a peroxidasa de rábano. Los complejos se revelaron por desarrollo de color al agregar diaminobenzidina tetrahidrocloreuro. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina de Harris. Se definió como presencia de apoptosis cuando al observar las laminillas en el microscopio de luz con el objetivo 40x se observó desarrollo de color marrón/sepia asociado al núcleo de las células.

2. Técnica de DAPI.⁴² Para confirmar la presencia de fragmentos de

DNA en los núcleos y correlacionar esta característica morfológica con el criterio bioquímico de la técnica de TUNEL, se tiñeron otras laminillas provenientes de las mismas muestras con el colorante fluorescente 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las laminillas se desparafinaron y rehidrataron como se señaló antes. Se agrega la solución de DAPI y se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Los tejidos se lavan y se montan para su observación. Se consideró apoptosis a la presencia de núcleos con apariencia de grumos aglomerados cuando se observaron las preparaciones al microscopio de epifluorescencia con filtro azul y con objetivo de inmersión a 100x. Se siguió la misma estrategia anterior con los observadores que calificaron y evaluaron la presencia de apoptosis con la técnica de TUNEL.

Identificación de mRNA de TNF- α en trofoblastos

Hibridación *in situ* para expresión de mRNA de TNF- α . Se prepararon nuevas laminillas de los casos colectados y se procesaron para la identificación de mRNA de TNF- α utilizando una ribsonda radiactiva y usando la técnica de Pardue y cols.⁴³ Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados con el método convencional. Los tejidos fueron digeridos con 0.2N HCl a temperatura ambiente, seguido de tratamiento a 70°C x 15 minutos en solución SSC 2x y posfijados en paraformaldehído al 4%. Luego de equilibrar las laminillas en Ditionitrol 10mM, se bloquearon con solución de iodoacetamida/N-ethylmaleimida, lavadas y secadas. Se preparó una ribsonda utilizando un plásmido en el que se insertó la secuencia del gene de TNF- α

humano correspondiente a los exones 3, 4A y 4, así como sus secuencias intermedias para generar una sonda de 126 bp, el inserto se encontraba flanqueado por los promotores SP6 y T7. Se realizó transcripción tipo *run-on* para generar las sondas sentido y contra-sentido, con incorporación de 35S-UTP (NEN, Dupont). Las sondas fueron agregadas a las laminillas, se hibridaron durante 12 horas, lavaron y después se agregó emulsión fotográfica diluída y se incubaron durante cuatro horas. Al cabo de este lapso se revelaron y contra-ñeron con hematoxilina/eosina. La reacción positiva se observa al microscopio de luz como gránulos sobre las células.

Análisis estadístico

Para la comparación de promedios de células apoptóticas entre los tres grupos de estudio se utilizó ANOVA, y para la comparación de proporciones de presencia de mRNA de TNF- α , prueba de Kruskal-Wallis. Para la medición de asociación entre apoptosis y TNF- α , prueba de Ji cuadrada. Se calculó la variación entre ambos observadores para la estimación de promedios de células con cada técnica, utilizando la prueba de t y la concordancia entre observadores con Kappa. Todas las pruebas con nivel de significancia $p < 0.05$.

■ RESULTADOS

Identificación de apoptosis en células trofoblásticas

Se estudiaron 24 pacientes, distribuidos en tres grupos. El primer grupo de ocho pacientes correspondió a los casos de aborto espontáneo recurrente de causa no identificada (AERi), con un promedio de 3.0 ± 1.0 abortos y edad gestacional de 14.6 ± 3.3 semanas. El segundo

Tabla I

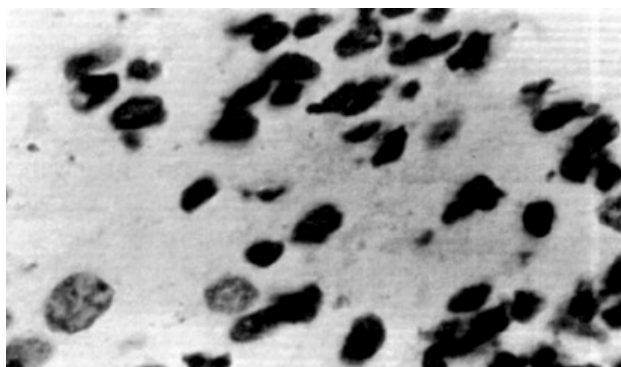
Características clínicas de las pacientes estudiadas

	AERi (n = 8)	Parto (n = 8)	Cesárea (n = 8)
Edad	25.5 $\pm$ 4.5 (18-32)	25.6 $\pm$ 6.5 (17-36)	27.5 $\pm$ 4.1 (20-35)
Semanas de gestación	14.6 $\pm$ 3.3(10-18)	40.1 $\pm$ 0.8(38-41)	39.0 $\pm$ 0.7(38-40)
Gesta Para	3.2 $\pm$ 1.1(2-5)	2.5 $\pm$ 1.3(1-4)	2.6 $\pm$ 0.7(2-4)
Aborto	0.2 $\pm$ 0.4(0-1)	2.0 $\pm$ 0.9(1-3)	0.3 $\pm$ 0.7(0-2)
Cesárea	3.0 $\pm$ 1.0(2-5)	0.25 $\pm$ 0.4(0-1)	0.1 $\pm$ 0.3(0-1)
Edad del esposo	0	0.3 $\pm$ 0.5(0-1)	2.12 $\pm$ 0.3(2-3)
	28.2 $\pm$ 3.9(24-35)	27.5 $\pm$ 8.9(18-40)	32.3 $\pm$ 4.3(27-38)

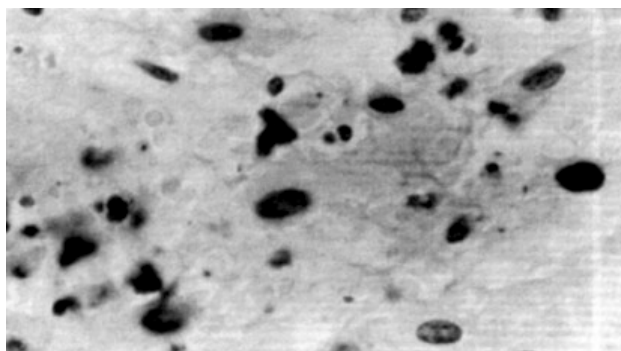
X $\pm$ DE (x). Promedio $\pm$ 1 desviación estándar (rango).

Figura 1 A, B y C.

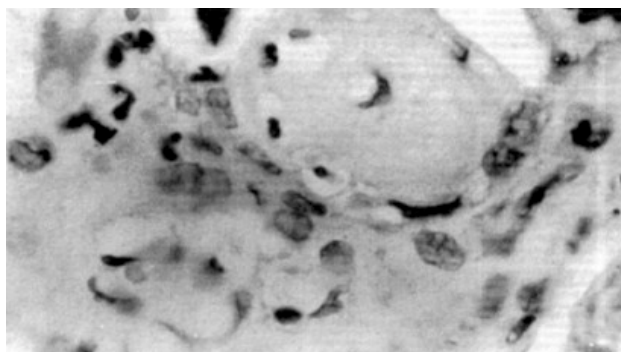
A



B



C



grupo de ocho pacientes lo constituyeron pacientes con embarazo a término de 40.1 ± 0.8 semanas de gestación y con trabajo de parto eutócico, con recién nacido vivo, sin complicaciones. El tercer grupo de ocho pacientes lo constituyeron pacientes con embarazo a término de 39.0 ± 0.7 semanas de gestación, sin trabajo de parto, programadas para cesárea electiva o interactiva. Las características clínicas generales se muestran en la tabla I.

Identificación de apoptosis por medio de las técnicas de TUNEL y DAPI

En las pacientes con AERI, la identificación de células apoptóticas con la técnica de TUNEL fue en promedio de 91.1 ± 6.7 y con intervalos de confianza de 95% para la media de (IC 95% 90.1, 92.2) Figura 1A. Para la técnica de DAPI el promedio fue 83.2 ± 12.8 y los intervalos de confianza (IC 95% de 80.6, 85.8) Figura 2A.

En las pacientes con PARTO, la identificación de células apoptóticas con la técnica de TUNEL fue en promedio de 49.3 ± 12.3 y con intervalos de confianza para la media de (IC 95% de 47.1, 51.5) Figura 1B. Para la técnica de DAPI el promedio fue 46.9 ± 12.9 y los intervalos de confianza (IC 95% de 44.9, 48.9) Figura 2B.

En las pacientes con CESÁREA, la identificación de células apoptóticas con la técnica de TUNEL fue en promedio de 7.85 ± 4.26 y con intervalos de confianza para la media de (IC 95% de 7.32, 8.38) Figura 1C. Para la técnica de DAPI el promedio fue 5.31 ± 3.63 y los intervalos de confianza (IC 95% de 4.60, 6.02) Figura 2C.

Comparación entre grupos

Al comparar los promedios de células apoptóticas tanto con la técnica de

TUNEL, como con DAPI, entre los grupos de pacientes con AERI, parto y cesárea. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los grupos ($p < 0.0001$).

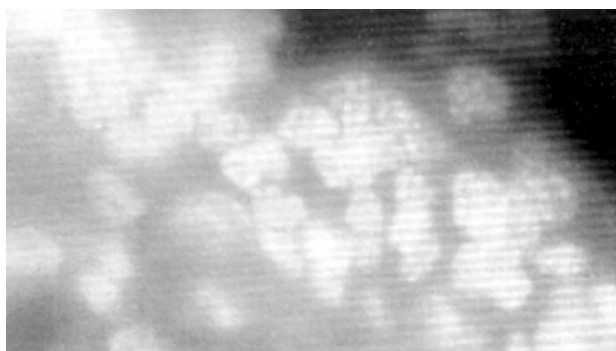
Variación entre observadores

Se calculó la variación entre observadores para valorar cada técnica al comparar las laminillas 1, 2 y 3 de cada paciente, en el mismo orden entre el observador 1 y el observador 2.

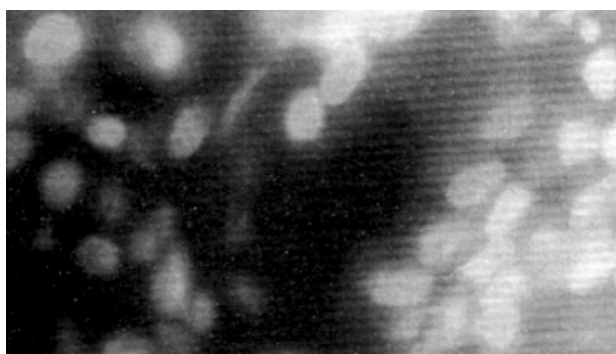
En el grupo de pacientes con AERI, con la técnica de TUNEL el observador 1 estimó un promedio de 92.7 ± 6.08 y el observador 2, un promedio de 89.5 ± 7.1 , no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.09$) entre ambos observadores. Con la técnica de DAPI el observador 1 estimó un promedio de 82.2 ± 11.7 y el observador 2, un promedio de 84.2 ± 14.08 . No se observaron

Figura 2 A, B y C.

A



B



C



diferencias estadísticas significativas ($p = 0.58$) entre ambos observadores.

En el grupo de pacientes con PARTO, con la técnica de TUNEL el observador 1 estimó un promedio de 46.8 ± 14.0 y el observador 2, un promedio de 51.7 ± 10.2 . No se observaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.16$) entre ambos observadores. Con la técnica de DAPI el observador 1 estimó un promedio de 46.3 ± 14.3 y el observador 2, un promedio de 47.5 ± 11.7 . No se observaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.76$) entre ambos observadores.

En el grupo de pacientes con CESÁREA, con la técnica de TUNEL el observador 1 estimó un promedio de 7.8 ± 4.9 y el observador 2, un promedio de 7.8 ± 3.5 . No se observaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.97$) entre ambos observadores. Con la técnica de DAPI el observador 1 estimó un promedio de 5.25 ± 3.73 y el observador 2, un promedio de 5.37 ± 3.60 . No se observaron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.90$) entre ambos observadores.

La concordancia entre observadores fue Kappa = 0.68

Comparación de ambas técnicas

Al comparar ambas técnicas en el grupo de pacientes con AERi. Con la técnica de TUNEL el promedio estimado fue de 92.7 ± 6.08 , y con la técnica de DAPI el promedio fue de 82.2 ± 11.7 . La comparación de ambas técnicas mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.003$). Es decir, la técnica de TUNEL sobreestima el número de células apoptóticas.

Al comparar ambas técnicas en el grupo de pacientes con PARTO. Con la técnica de TUNEL el promedio estimado fue de 46.8 ± 14.0 , y

con la técnica de DAPI el promedio fue de 46.3 ± 14.3 . La comparación de estas técnicas no observó diferencia estadísticamente significativa en este grupo de pacientes ($p = 0.91$).

Al comparar ambas técnicas en el grupo de pacientes con CESÁREA. Con la técnica de TUNEL el promedio estimado fue de 7.8 ± 4.9 , y con la técnica de DAPI el promedio fue de 5.2 ± 3.7 . La comparación de estas técnicas mostró diferencias estadísticamente significativa ($p = 0.044$). Por lo tanto con la técnica de TUNEL se sobreestima el número de células con apoptosis.

■ IDENTIFICACIÓN DE mRNA DE TNF- α EN EL CITOTROFOBlasto

Se estudiaron 12 pacientes, cuatro casos de cada uno de los grupos de estudio. La identificación de mRNA de TNF- α fue posible en todos los casos de cortes de placenta de los grupos estudiados. Por otro lado, a pesar de ajustes múltiples a las condiciones de hibridación y lavado, en todos los casos evaluados, se detectó presencia de sonda pegada de modo inespecífico al fondo de las laminillas. Se decidió que esta señal era inespecífica (*background*) debido a que aparecía solamente con la sonda sentido (*sense*) y sistemáticamente se le encontraba asociada al fondo de la laminilla y nunca al tejido. De este mismo modo, la sonda antisentido (*antisense*) siempre reconoció un componente asociado a células y no al fondo de la laminilla.

El mayor número de gránulos radiactivos se encontró en los casos de AERi, en los que fue posible demostrar que hasta 60% de las células con morfología y localización de trofoblastos vellosos fueron positivas para el mRNA de

TNF- α (Figura 3A, 3B). La señal no fue detectada cuando se utilizó la sonda *sense* (Figura 3C).

Los cortes de placentas de casos con trabajo de parto mostraron gránulos positivos escasos, localizados en no más de 3% de las células totales, aunque la hibridación con la sonda *sense* mostró unión no específica.

Los tejidos placentarios derivados de cesáreas no mostraron positividad para la expresión del mRNA de TNF- α , aunque fue posible identificar algunas células, con morfología de trofoblasto con algunos gránulos positivos en no más de 1% de las células, que aparecieron también en los cortes hibridados con la sonda *sense*.

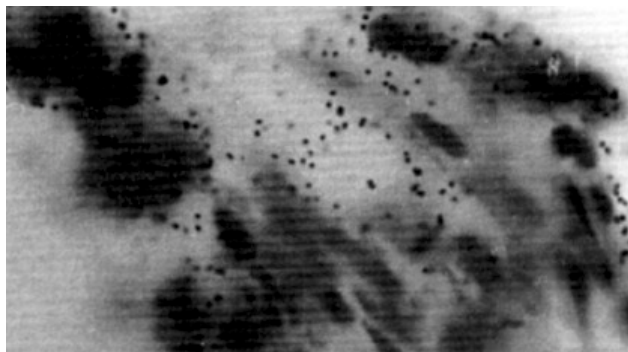
Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$). Además se observó una estrecha asociación entre la presencia del mRNA de TNF- α en el trofoblasto y el número de células que fueron positivas para presencia de apoptosis ($p < 0.0001$).

■ COMENTARIO

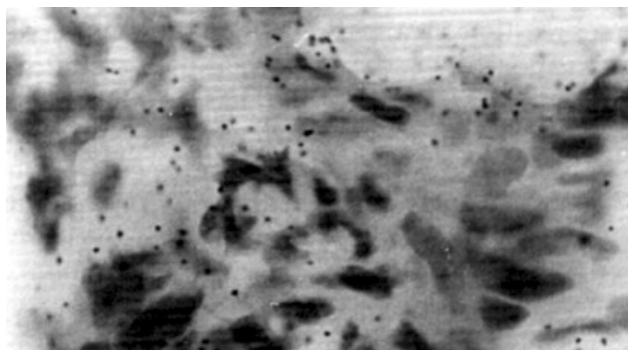
El aborto espontáneo recurrente de causa no identificada o idiopático es un problema de salud reproductiva que se manifiesta en muy diferentes esferas y dado que desconocemos los mecanismos que lo condicionan, es poco probable modificar su curso natural. Por ello, las medidas preventivas y terapéuticas son inexistentes hasta la fecha, haciendo el manejo médico de estos casos un problema con connotaciones que frecuentemente implican dilemas éticos.

En este trabajo se ha iniciado el estudio de uno de los mecanismos que podrían mediar el daño en esta patología del embarazo humano.

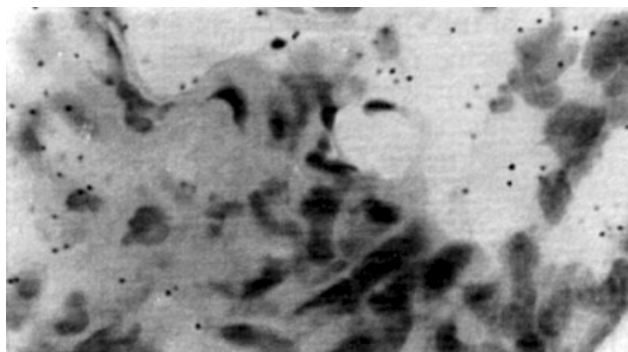
Figura 3 A, B y C



A



B



C

La hipótesis general que se propone en esta línea de investigación, señala que en los casos de pacientes con aborto espontáneo recurrente de causa no identificada (AERi), existen fenómenos en el entorno materno/feto/placentario que se manifiestan en daño en la funcionalidad y/o vitalidad del tejido placentario. La hipótesis planteada

fue consistente con el hallazgo de activación masiva de muerte celular programada en todos los casos con AERi estudiados en este trabajo. El fenómeno de activación generalizada de apoptosis no ha sido informado en pacientes con AERi hasta el momento, aunque se ha sugerido en la literatura la posible conexión entre la expresión

de TNF- α en tejidos placentarios y su efecto de citocina abortogénica mediado por activación de apoptosis local. Lea y col.,⁴⁴ identificaron la presencia *in situ* de TNF- α inmunorreactivo en células trofoblásticas de pacientes con AERi, con una expresión muy parecida a la que se encontró en el presente estudio; desafortunadamente, en el estudio de Lea y col.⁴⁴ no se controló la especificidad de la asociación, utilizando otros tejidos placentarios. En este sentido, la inclusión de dos grupos control en nuestro estudio nos permitió evaluar la posible existencia de variables confusorias en la interpretación de los fenómenos explorados. Es importante resaltar que este estudio es el primero en el que se incluye una selección clínica exhaustiva de verdaderos casos de AERi idiopáticos, que por definición incluye aquellos casos en los que se ha agotado la búsqueda de factores desencadenantes y/o asociados. Al mismo tiempo, se definió con el mismo cuidado la selección de todos los pacientes de los grupos con trabajo de parto normal y cesárea. Esta es una de las mejores virtudes del presente estudio ya que es precisamente en la definición de los grupos en estudio clínico donde se explican la mayor parte de las divergencias en las concentraciones. Con este enfoque, es posible distinguir que la inducción de apoptosis está relacionada con un mecanismo, probablemente fisiológico, que marca el final de la gestación y que coincide con el trabajo de parto. Esta conclusión sólo es posible al comparar el evento en los grupos con embarazo a término con y sin trabajo de parto, corregidos para la edad gestacional, en los que se demostró que no es un evento ligado a la cronología del

embarazo, sino al momento en que aparecen los fenómenos del parto. De este modo, también es posible concluir que en los casos con AERi el número de células con apoptosis es cuantitativamente mayor que durante el trabajo de parto normal, aunque en este último existe un número grande de células experimentando muerte celular programada. La presencia de células del trofoblasto experimentando apoptosis durante el trabajo de parto se ha demostrado en algunos estudios, utilizando modelos animales experimentales y en muestras humanas^{25,45} y se ha sugerido que se trata de un mecanismo que permite la eliminación del tejido placentario sin las consecuencias de la necrosis y el fenómeno inflamatorio subsecuente.³⁰ Aunque en los resultados de Smith y cols.⁴⁵ se muestra que existe un incremento conforme avanza el embarazo, el resultado al final del embarazo en cuanto a promedio de células apoptóticas es similar en nuestro grupo de pacientes, *sin trabajo de parto*; pero, difiere de manera significativa de las pacientes con trabajo de parto, ya que en sus resultados no es mayor de 1%, en cambio en nuestro estudio es cercano a 50% con ambas técnicas.

La identificación de células positivas a muerte celular programada no es un problema técnico trivial y para aceptar la demostración de su presencia es necesario confirmar la positividad con otra técnica alterna, que generalmente es la identificación morfológica y un criterio bioquímico, como lo sugieren Ansari y cols.⁴⁶ Esta presunción quedó manifiesta en este estudio al comparar las técnicas de TUNEL y DAPI, en su capacidad para distinguir verdaderas células en apoptosis. Dado que la técnica

de TUNEL se basa en la actividad de una enzima que reconoce extremos terminales libres de polinucleótidos, no es capaz de distinguir el DNA roto por acción de nucleasas presentes durante el fenómeno de necrosis. Por otro lado, la técnica de DAPI es más confiable ya que el elemento de calificación reside en *detalles morfológicos del núcleo* que son característicos de las fases intermedias de la apoptosis. Por los fines de este estudio, el estándar de oro para calificar la presencia de muerte celular programada, fue la técnica de tinción con DAPI. La comparación de ambas técnicas muestra que TUNEL tiende a sobreestimar el número de células apoptóticas, y tal y como lo encontraron Grasln-Kraup y cols., quienes informaron alta tasa de falsos positivos con la técnica de TUNEL.⁴⁷

Al iniciar la caracterización de los posibles mecanismos fisiopatogénicos que podrían conducir a la activación de muerte celular programada en los tejidos placentarios de casos con AERi, se planteó inmediatamente la necesidad de establecer la asociación temporal entre los eventos de apoptosis y la expresión simultánea y/o sincrónica del TNF- α , citocina que ha sido señalada como un mediador potencial de este proceso. La inmunodetección del TNF- α en los tejidos, puede conducir a localización de fuentes celulares espurias de TNF- α , ya que los anticuerpos solamente revelan la presencia de la proteína inmunorreactiva y no señalan el proceso activo de síntesis de la citocina, por esa razón, se decidió detectar el mRNA del TNF- α por hibridación *in situ* y corroborar la síntesis activa de la proteína y al mismo tiempo ubicar el linaje celular involucrado. Con este enfo-

que, se pudo demostrar la existencia de asociación temporal entre sobreexpresión del mRNA de TNF- α y presencia de apoptosis en trofoblasto de pacientes con AERi. Hay que insistir en que este hallazgo se debe caracterizar como una asociación y aunque es muy posible establecer un lazo de mecanismo hipotético inmediato, nuestro estudio no exploró la asociación causal entre expresión de TNF- α y apoptosis. Esta observación fue primitiva del grupo de AERi y ello refuerza la posibilidad de que en el AERi operen mecanismos fisiopatogénicos específicos y que además no se encuentran presentes en los eventos obstétricos normales (parto o cesárea).

La coincidencia de sobreexpresión del mRNA de TNF- α y presencia de apoptosis en las placentas con AERi, permite proponer la posibilidad de que el trofoblasto se encuentre en un mecanismo auto-crino de suicidio. De este modo, el trofoblasto estaría secretando una citocina que resultaría citotóxica para el propio tejido placentario, que al contar con receptores para TNF- α , interpretaría la estimulación como una señal de activación de muerte celular. Y aunque en el embarazo a término con trabajo de parto fue posible demostrar presencia de apoptosis, en estos tejidos, cuantitativamente existe menor expresión del mRNA de TNF- α , lo cual hace pensar que una posibilidad es que la muerte celular programada se encuentre activada por otra señal o bien, que el propio TNF- α provenga de células extra-placentarias.

Como se mencionó, los fenómenos de muerte celular programada parecen inducirse también durante el parto normal, sin afectar una proporción de células tan grande

como en las placentas de AERi y **no** coinciden con los resultados mostrados por el grupo de Smith y col.⁴⁵ "en este trabajo la proporción de células con apoptosis en parto normal excede en forma significativa".

El posible desbalance de secreción de citocinas proinflamatorias durante el AERi, podría encontrar sustento en la observación de parto pretérmino y mayor producción de TNF- α . De ser así, el efecto de daño celular sería mediado por TNF- α principalmente. Entonces si TNF- α es la citocina importante en la inducción de apoptosis en las pacientes

con AERi, y al margen de su significado biológico, quedaría por determinar su utilidad clínica, es decir, validar la información que da esta citocina como marcador clínico, estableciendo su valor diagnóstico y predictivo. Al respecto existen escasos informes de que TNF- α está elevada en forma significativa en estas pacientes,^{31,32} faltando aún su uso como una herramienta de utilidad clínica diagnóstica o terapéutica. En conclusión, los resultados obtenidos de este estudio, demuestran que el daño al trofoblasto de pacientes con AERi es vía

apoptosis, existiendo asociación entre la expresión de mRNA de TNF- α en el citotrofoblasto y la proporción de células apoptóticas. Esta asociación sugiere que TNF- α juega un papel importante en la inducción de apoptosis en las pacientes con AERi.

■ AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por las autoridades de la Universidad Autónoma de Sinaloa y del Instituto Mexicano del Seguro Social, a los programas de investigación en salud.

■ REFERENCIAS

1. Daya S. *Aborto habitual*. En: Copeland LJ, Jarrell JF, McGregor JA, eds. *Ginecología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A., 1994: 200.
2. Hill JA. *Sporadic and recurrent spontaneous abortion*. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1994; 17: 116-62.
3. Hill JA, Ravnkar VA. *Recurrent abortion*. In: Ryan KJ, Berkowitz R, Barbieri RL, eds. *Kistner's Gynecology*. Principles and practice. Fifth edition. Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc. 1990, 406-30.
4. Parrilla JJ. *Aborto recurrente. Definiciones, incidencia y factores epidemiológicos*. *Cuad Med Reprod* 1997; 3: 12-23.
5. Plouffe L, Tho SPT, Hansen K. *Basic workup of the couple with recurrent pregnancy loss*. *Infertil Reprod Med Clinics of North America* 1996; 7: 825-46.
6. ACOG Technical Bulletin: Early pregnancy loss 1995: 212.
7. The American Fertility Society Guidelines for Practice: Recurrent pregnancy loss. 1993.
8. Berry C. *The Euro-team early pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage*. *Hum Reprod* 1995; 10: 1516-20.
9. Plouffe L. Jr., White EW, Tho SP, et al. *Etiologies and subsequent reproductive performance of couples with recurrent abortion: Have we made any progress in the past ten years?* *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 313-5.
10. Dudley DJ. *Recurrent pregnancy loss and cytokines*. *JAMA* 1995; 273: 1958-9.
11. Scott JR, Branch DW. *Evaluation and treatment of recurrent miscarriages*. In: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR, eds. *Infertility: Evaluation and treatment*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 230-48.
12. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. *Documentos de Consenso. Grupo aborto de repetición*. Meditex. Madrid 1996: 157-81.
13. Daya S. *Evaluation and management of recurrent spontaneous abortion*. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1996; 8: 188-92.
14. Coulam C. *Epidemiology of recurrent spontaneous abortion*. *Am J Reprod Immunol* 1991; 26: 23-7.
15. Balasch J. *Diagnóstico y tratamiento del aborto de repetición: Un enfoque racional*. En: Remohi J. Eds. *Reproducción Humana*. Madrid: McGraw-Hill 1996: 204-13.
16. Harger JH, Archer DF, Marchese SG, et al. *Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies*. *Obstet Gynecol* 1983; 62: 574-81.
17. Stirrat GM. *Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology*. *Lancet* 1990; 336: 673-75.
18. Clifford K. *Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage*. *Hum Reprod* 1997; 12: 387-9.
19. Poland BJ, Miller JR, Jones DC, et al. *Reproductive counseling in patients who have had a spontaneous abortion*. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 127: 685-91.
20. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?* *Immunology Today* 1993; 9: 353-6.
21. Romagnani S. *Short analytical review: Th1 and Th2 in human diseases*. *Clinical Immunopathol* 1996; 80: 225-35.
22. Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG. *Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface*. *J Immunol* 1993; 151: 4562-73.
23. Jokhi PP, King A, Sharkey AM, Smith SK, Loke YW. *Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidua lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction*. *J Immunol* 1994; 153: 4427-35.
24. Jokhi PP, King A, Loke YW. *Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidua large granular lymphocytes*. *Hum Reprod* 1994; 9: 1660-9.
25. Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. *Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy*. *J Reprod Fert* 1990; 89: 447-58.
26. Arck PC, Troutt AB, Clark DA. *Soluble receptors neutralizing TNF- α and IL-1 block stress-triggered murine abortion*. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 262-6.
27. Clark DA, Chaouat G. *Spontaneous abortion in DBA/2-mated mice is due to cytokines and not trophoblast killing by asialoGM1+ cells of NO-producing macrophages*. *Am J Reprod Immunol* 1996; 35: 354.
28. Ark PC, Merali FS, Stanis A, Stead R, Chaouat G, Manuel J, Clark DA. *Stress-induced murine abortion associated with substance-P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua*. *Biol Reprod* 1995; 53: 814-9.
29. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H. *Analysis of TNF- α -induced DNA strand breaks at the single cell level*. *Am J Pathol* 1991; 139: 251.

30. Yui J, García-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994; 15: 819-35.
31. Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-Helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 273: 1933-6.
32. Müeller-Eckhardt G, Mallmann P, Neppert J, Lattermann A, Melk A, Heine O, et al. Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. *J Reprod Immunol* 1994; 27: 95-109.
33. García-Lloret MI, Morris DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CFS-1 and GM-CFS stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res* 1994; 214: 46-54.
34. Wilson AG, Symons JA, McDowell TI, Mc Devitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor-alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-9.
35. Brinkman BMN, Zuijdgheest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CI. Relevance of the tumor necrosis alpha (TNF- α) -308 promoter polymorphism in TNF-alpha gene regulation. *Journal of Inflammation* 1996; 46: 32-41.
36. Stuber F, Udalova A, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, Schde FU, Nedospasov SA. -308 Tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *Journal of inflammation* 1996; 46: 42-50.
37. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992; 149: 1470-5.
38. Yamamura M, Uyemura M, Uyemura K, Dears RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Definition protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254: 277-9.
39. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, et al. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 336-41.
40. Sgonc R, Wick G. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 327.
41. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
42. DAPI.
43. Pardue MI. *In situ hybridization*. In: Hames BD, Higgins SJ, eds. *Nucleic acid hybridization: a practical approach*. Oxford: IRL Press: 1985; 179-202.
44. Lea RG, Tulppala M, Critchley HO. Deficient syncytiotrophoblast tumor necrosis-alpha characterizes failing first trimester pregnancies in a subgroup of recurrent miscarriage patients. *Hum Reprod* 1997; 12: 1313-20.
45. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 57-65.
46. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. *In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states*. *J Pathol* 1993; 170: 1-8.
47. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. *In situ detection of fragmented DNA (TUNEL Assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note*. *Hepatology* 1995; 21: 1465-8.

Cultivo de blastocistos con medios secuenciales

■ Dr. Alberto Hernández Campos¹, Dr. Francisco Vélez Pérez¹, Dr. Francisco Navarro Aguirre¹, Dr. Eric Saucedo de la Lata¹, Dra. Lidia Arenas Montezco¹, Dra. Mónica Ruy Sánchez Aguilar¹, Biol. Genaro García Villafañá¹, Biol. Michael Tucker², Biol. Barry Behr³, Dr. Roberto Santos Haliscak¹, Dr. Pedro Galache Vega¹, Dr. Samuel Hernández Ayup¹

■ RESUMEN

Son bien conocidas las ventajas de cultivar preembriones humanos hasta etapa de blastocisto. Esto no es nuevo, lo que es reciente es el empleo de medios de cultivo secuenciales sin el apoyo de células somáticas. El objetivo fue cultivar preembriones humanos hasta etapa de blastocisto para determinar las tasas de recuperación, tasa de implantación y tasa de embarazo en pacientes sometidas a FIVT/TE o ICSI. Una vez obtenidos los óvulos de las pacientes, fueron inseminados/inyectados para posteriormente ser cultivados por 72 horas, usando medio P1 al 10% de SSS bajo aceite mineral para posteriormente ser transferidos a un medio complejo para cultivo de blastocistos por 48 horas, y finalmente ser transferidos. Se incluyeron 13 pacientes (9 de FIV y 4 de ICSI) obteniendo 205 óvulos, fertilizaron 143 y 131 tuvieron división celular. Se cultivaron 121 preembriones a etapa de blastocisto de los cuales 53 alcanzaron esa etapa (43.8%), transfiriendo 28 y congelando 25. En promedio se transfirieron 2.1 blastocistos por paciente. Se presentaron cuatro embarazos y un recién nacido vivo a término para una tasa de implantación de 14.2% y una tasa de embarazo de 30%. El estudio

muestra nuestra experiencia inicial, la cual demostró una aceptable tasa de recuperación de blastocistos y de embarazo.

(Hernández C, A y col: *Cultivo de blastocistos humanos con medios secuenciales*. Ginec Obst Mex 2000; 68:132).

■ SUMMARY

The advantages of cultivating human pre-embryos to the stage of blastocites, are well known. The use of media of culture sequential, without the backing of somatic cells, is new. The objective was to cultivate human pre-embryos to the stage of blastocite to the determine the recuperation indexes, implantation index and pregnancy index in patients subjected to FIVT/TE or ICSI. Once obtained the ovules of patients were injected/inseminated to latter be cultivated for 72 hours using P1 medium at 10% of SSS under mineral oil for, latter, be transferred to a complex medium for blastocites culture for 48 hours, and finally be transferred. Thirteen were included (9 of FIV and 4 of ICSI) obtaining 205 ovules; fertilized 143 and 131 had callular division. One hundred and twenty one pre-embryos were cultivated to blastocist stage, from which, 53 reached that stage (43.8%); trans-

ferring 28 and freezing 25. In average, 2.1 blastocists were transferred by patient. There were four pregnancies and one alive newborn, at term for an index of implantation of 14.2% and a pregnancy index of 30.7%. The study shows our initial experience, which demonstrated and acceptable idea of recuperation of blastocists and pregnancies.

(Hernández C., A. y col: *Human blastocysts culture with sequential media*. Ginec Obst Mex 200; 68:132).

Las ventajas inherentes de tener la capacidad de cultivar embriones humanos hasta la etapa de blastocistos es bien conocida,¹⁻⁷ por lo que el cultivo de blastocistos no es nuevo. Sin embargo, lo que se puede considerar nuevo es el método por el cual se pueden cultivar. En el pasado se han empleado medios simples^{2,8} y técnicas de cocultivo con células somáticas,^{1,9} sin embargo, ninguno ha demostrado mejorar significativamente las tasas de implantación. Por el contrario, el desarrollo de medios de cultivo secuenciales ha permitido el cultivo de blastocistos altamente viables con tasas de implantación de alrededor de 50% que culminan en tasas de embarazo de cerca de 60% con sólo dos blasto-

¹Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, N.L. México.

²Laboratory Director. Shady Grove Reproductive Science Center, Rockville, Maryland, USA.

³Director IVF/ART Laboratories. Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

Trabajo premiado con el Tercer Lugar en Investigación Clínica; 50º Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia, Méx. D.F.

cistos transferidos disminuyendo el riesgo de embarazo múltiple y el número de preembriones congelados.¹⁰

■ OBJETIVO

Cultivar preembriones humanos hasta etapa de blastocisto usando medios de cultivo secuenciales sin el apoyo de células en cocultivo, determinando la tasa de recuperación de los mismos para ser transferidos y determinar la tasa de implantación y de embarazo en pacientes sometidas a un programa de fertilización *in vitro* e inyección intracitoplásmica de espermatozoides.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio prospectivo, longitudinal y descriptivo en el cual se incluyeron pacientes con esterilidad que se sometieron a un programa de reproducción asistida ya sea fertilización *in vitro* con transferencia de embriones (FIV-TE) o inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) de agosto de 1998 a julio de 1999 a las cuales se les informó de antemano y se obtuvo consentimiento escrito para ingresar al protocolo de estudio. Los criterios de inclusión fueron pacientes con expectativas de obtener más de 10 óvulos al momento de la aspiración y que hubieran aceptado participar en el estudio. Se excluyeron aquellas pacientes en las cuales se obtuvo pobre respuesta a la inducción de ovulación y las que no otorgaran consentimiento escrito. Las pacientes fueron sometidas a un protocolo de hiperestimulación ovárica estándar con el empleo de anticonceptivos orales (Nordet®, Laboratorios Wyeth, México) una tableta diaria por 21 días desde el ciclo previo a ser estimulado para programar la fecha de menstruación, junto con análogos de GnRH-

acetato de lauprolide- (Lucrin®, Abbot Laboratories, England, UK) 0.5 mg diarios subcutáneo desde la fase lútea media del ciclo previo a ser estimulado para lograr supresión hipofisiaria, disminuyendo la dosis a 0.25 mg diarios hasta el día de administración de hormona gonadotropina coriónica - hCG - (Profasi®, Laboratorios Serono, México). Se realizó la estimulación ovárica empleando una combinación de gonadotropinas menopáusicas humanas (Pergonal®, Laboratorios Serono, México) y urofollitropina - FSH altamente purificada urinaria- (Fertinorm-HP®, Laboratorios Serono, México) o bien, follitropina alfa recombinante - rFSH- (Gonal-F®, Laboratorios Serono, México) por vía intramuscular diariamente determinando la dosis individual de acuerdo a la edad, índice de masa corporal, etc. iniciando el segundo día del ciclo y ajustando la dosis de acuerdo a la respuesta ovárica de cada paciente. Se realizó vigilancia del crecimiento folicular por medio de ultrasonido transvaginal seriado con transductor de 6.5 MHz (Hitachi EUB-405, Hitachi Medical Corp., Tokyo, Japón) y determinaciones seriadas de estradiol sérico en sangre por medio de radioinmunoensayo en fase sólida con contador de centelleo sólido (Coat-A-Count® Isocomp I, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, USA) hasta el día de administración de hCG. Una vez que se observaron al menos tres folículos con diámetros mayores a 18mm. Se administró Profasi® 10,000 UI por vía intramuscular de 32 a 34 horas. antes de la aparición folicular transvaginal guiada por ultrasonido, la cual se realizó en una sala de quirófano bajo sedación endovenosa usando propofol (Diprivan®,

Laboratorios Zeneca, México) intravenoso a dosis calculada por el médico anestesiólogo usando un ultrasonido con transductor vaginal de 5 MHz (Hitachi EUB-315, Hitachi Medical Corp., Tokyo, Japón) con aguja de una luz (transvaginal Echotip Asch 17 GA 35 mm, Cook Group Company, Spencer, Indiana, USA), tubos de aspiración de poliestireno (Falcon® 2001, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) para recolectar el líquido folicular y una bomba de aspiración (Pioneer Pro-Pump, Gen X International, Inc. Madison, CT, USA) lavando cada folículo con medio HTF modificado (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) el líquido folicular fue examinado bajo campana de flujo laminar (Nuair® NU-201-430 serie 19, Nuair, Plymouth, MN, USA) y con estereomicroscopio (Olympus SZ60 Olympus Optical, Co. LTD, Japon) y pipeta Pasteur en caja de Petri (Falcon® 1029, Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) en platina caliente a 37°C, realizando disección del *cumulus oophorus* de los óvulos retirando detritus celulares, coágulos hemáticos, etc. lavándolos posteriormente con medio HTF Quinn suplementado al 10% con suero sintético sustituto-SSS- (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA), clasificándolos como inmaduros, maduros y posmaduros de acuerdo a la clasificación de Veeck.¹¹ La muestra de semen fue obtenida por eyaculado, preparando el semen por medio de técnica de gradientes con empleo de Isolate (Isolate stock 90% y upper/lower medium, Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) en caso de FIV o por medio de técnica de lavado y resuspendido con medio HTF 5% (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA).

En el caso de FIV los óvulos fueron inseminados dos a cuatro horas después de su aparición en grupos de 10 con 50-80,000 espermatozoides/mL; en el caso de ICSI fueron inyectados usando microscopio de fase invertida (Nikon Eclipse TE 300, Nikon Corp., Tokyo, Japon), micromanipuladores (Nikon Narashige, Nikon Corp., Tokyo, Japon) con microinyectores (RI Limited, Penryn, Cornwall England) así como micropipetas de manipulación y de inyección rectas (Huma-gen, Charlottesville, Virginia, USA) en platina caliente a 37°C (Thermoplate®, MATS-USSR30, Tokai Hit Co., LTD, Japon) en medio HTF al 5% de albúmina (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) así como hialuronidasa tipo VII y polivinilpirrolidona (Hyasa-10x y PVP, Scandinavian IVF Science AB, Gothenburg, Sweden) para denudar los oocitos (por no más de 15 seg) de las células de granulosa y mantener los espermatozoides. Se inseminaron o inyectaron (según el caso) los óvulos en metafase II para posteriormente ser incubados por 18-20 horas. en medio P1 al 10% de SSS 150 µL bajo aceite mineral (Irvine Scientific, Santa Ana, California) en incubadora (Forma Scientific 3110, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) a 37°C en un medio ambiente con 5% CO₂, 5% O₂ y 90% de N₂, revisando 24 horas. después la fertilización y comprobándola por la presencia de dos pronúcleos y dos cuerpos polares, removiendo con pipeta Pasteur adelgazada en flama las células de la granulosa adheridas y descartando los preembriones sin fertilización o con fertilización anómala. Después de la fertilización todos los preembriones fueron cultivados en una gota de 150 µL de medio P1 al 10% de SSS bajo aceite mineral (Irvine Sci-

entific, Santa Ana, California, USA) incubándose por 24 horas al cabo de las cuales se verificó la división celular y volviendo a incubar por 24 horas con mismo medio de cultivo. A las 72 horas se verificó la división celular contando el número de células de cada preembrión para ser clasificados también de acuerdo a la clasificación de Veeck¹¹ transferidos después a un medio complejo de cultivo de blastocistos suplementado con SSS al 10% bajo aceite mineral (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA) siendo incubados por 48 horas más. En un día 5 postaspiración se revisó la presencia de blastocisto revisando sus características – expandido, cavitado, etc. – según la clasificación de Tucker (comunicación personal) seleccionando aquellos que presentaban masa celular interna bien definida, cavidad trofoblástica, expansión total del mismo y zona pelúcida delgada entre otras, siendo seleccionados para su transferencia la cual se llevó a cabo con catéter Soft-Pass® (Cook Group Company, Spencer, Indiana, USA) en medio de transferencia con 50% de SSS con HTF-HEPES (Irvine Scientific, Santa Ana, California) en volumen total de 15-20 µL Se suplementó la fase lútea con progesterona vaginal 90 mg al 8% diarios (Crinone® gel 8%, Wyeth Laboratories, England, UK) por 14 días al cabo de los cuales se determinó la fracción beta de hormona gonadotropina coriónica humana en sangre cuantitativa para detectar embarazo por ensayo de micropartícula enzimática (Axsym® system, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). En caso de ser positiva (> 25 UI) se continúa la administración de progesterona por 60 días adicionales y se realiza ultrasonido transvaginal a las

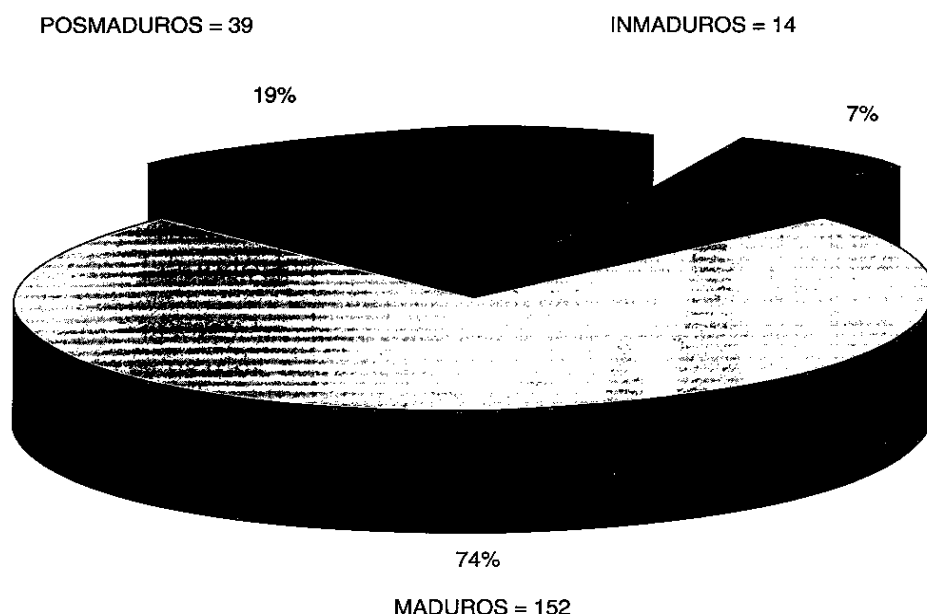
cuatro semanas de la transferencia para determinar la presencia de saco gestacional y de embrión con latido cardíaco. En los blastocistos que se congelaron se usó la técnica de Menezo de dos pasos con sucrosa y en caso de congelar en día dos o tres se usa el protocolo de Testart modificado²⁰⁻²² utilizando un aparato de congelación (Planer Kryo 10 serie III®, Planer Products, LTD, England) en un tiempo de 90 minutos.

Los datos se recabaron de los expedientes clínicos y se empleó una computadora comercial pentium II 233 MHz con programa Excel 97 para la captura de datos y análisis de los mismos, presentados en proporciones y porcentajes.

■ RESULTADOS

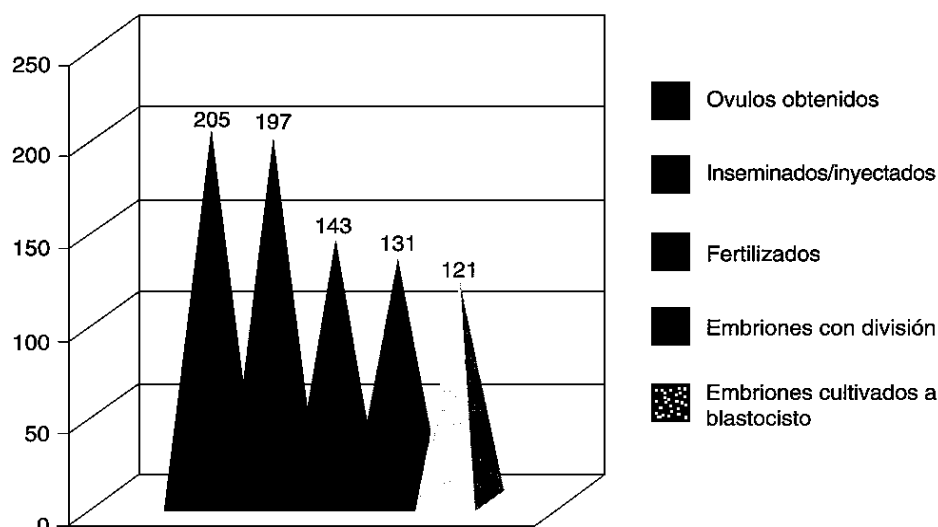
Se incluyeron 13 pacientes, nueve del grupo de FIV/TE y cuatro del grupo ICSI. No se excluyó ninguna paciente. La edad promedio de las pacientes fue de 31.1 años. El esquema para inducción de ovulación fue hMG/FSH en 10 casos y rFSH en tres casos. Se usó acetato de leuprolide en todas las pacientes. La cifra de estradiol promedio fue de 3,389 pg/mL en el día de administración de hCG. Se realizó la aspiración folicular en día 12 en un paciente, seis en día 13, cinco en día 14 y uno en día 15. Se obtuvieron en total 205 óvulos, 15.7 óvulos en promedio por paciente, de los cuales 152 fueron maduros (74.1%) 14 inmaduros (6.9%) y 39 posmaduros (19.0%). Se inseminaron/inyectaron (según FIV-ICSI) 197 óvulos presentando fertilización 143 (72.5%) de los cuales 131 (91.6%) presentaron división celular en el día dos o a las 48 horas después de la aspiración. 75 preembriones eran grado I (57.3%), 53 grado II (40.5%) y tres grado III (2.2%). Se dejaron cultivando a

Figura I



Número de óvulos obtenidos

Figura 1



Evolución de gametos

etapa de blastocisto 121 preembriones en día 3 (72 horas postaspiración) de los cuales 53 alcanzaron la etapa a día 5 (120 horas. postaspiración) que representa 43.8%. Se congelaron 25 blastocistos, algunos de ellos en etapa de día

seis, dado que no habían alcanzado su expansión completa en día cinco; congelándose además ocho embriones en día tres. En total se transfirieron 28 blastocistos en día cinco con catéter Soft-Pass, excepto tres que se transfirieron con catéter-

aguja de Kato-Asch por vía transmiometrial por estenosis cervical importantes. En promedio se transfirieron 2.1 blastocistos por paciente. Se presentaron cuatro embarazos detectados por B-hCG cuantitativas en sangre, detectando cuatro sacos gestacionales y posteriormente cuatro embriones con latido cardiaco en cuatro pacientes, para una tasa de implantación (sacos gestacionales/embriones transferidos) de 14.2%, con tasa de embarazo por transferencia de 30.7%. De los cuatro embarazos existe un recién nacido vivo a término y tres embarazos actualmente con buena evolución. No existieron embarazos múltiples.

■ COMENTARIO

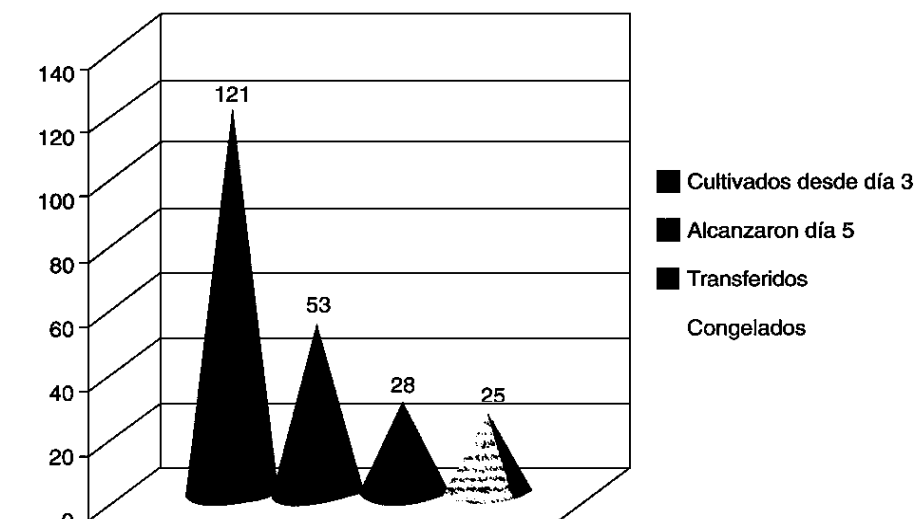
Jean Purdy fue el primero en observar un blastocisto humano.¹² En la última década ha existido un resurgimiento del interés en la fisiología embrionaria que ha culminado con el desarrollo de nuevos medios de cultivo de embriones en varias especies, entre ellas el humano. Desde hace más de 20 años en que se informó el primer nacimiento de un ser humano por medio de FIV, las tasas de implantación se han mantenido relativamente constantes a pesar de múltiples modificaciones en los medios de cultivo.^{6,13} Es importante recalcar que en forma normal, al llegar el embrión al útero lo hace ya que en etapa de blastocisto y no en 4-8 células.¹⁴ Al transferir en esa etapa, el embrión se expone a un medio ambiente distinto al que encuentra en el interior de la trompa de Falopio, entre el que se encuentra el pH, el gradiente de concentración de glucosa, de nutrientes, etc. lo que significa estrés para el embrión con la subsecuente pérdida de via-

bilidad^{15,16} Se ha observado también que el embrión es capaz de regular los cambios metabólicos por sí mismo en forma gradual conforme avanza a la cavidad uterina, lo que significa un grado de madurez creciente.^{17,18} Otra consideración estriba en que después de la etapa de ocho células inicia la transcripción del genoma humano, por lo que al transferir embriones en día 2-3 impide la selección natural de aquellos embriones con menor o mayor potencial de crecimiento.^{19,20}

Sabemos que se pueden cultivar blastocistos con medios simples e incluso sin glucosa (la cual es muy importante una vez que se ha iniciado la transcripción del genoma) pero la calidad de los mismos no es la óptima.² Se han dilucidado los requerimientos de aminoácidos, glucosa, oxígeno y otros nutrientes del embrión, lo que ha permitido el desarrollo de los nuevos medios de cultivo para blastocisto por etapas tratando de simular la fisiología normal.^{21,22} La formulación de los nuevos medios de cultivo incluye aminoácidos no esenciales, glutamina y un quelante para las primeras 48 horas seguido de una mezcla de aminoácidos esenciales y no esenciales, con vitaminas específicas y predominancia de glucosa para favorecer la glucólisis anaerobia, la formación de una buena masa celular interna y por consiguiente mayor capacidad de invasión del endometrio.²³⁻²⁶

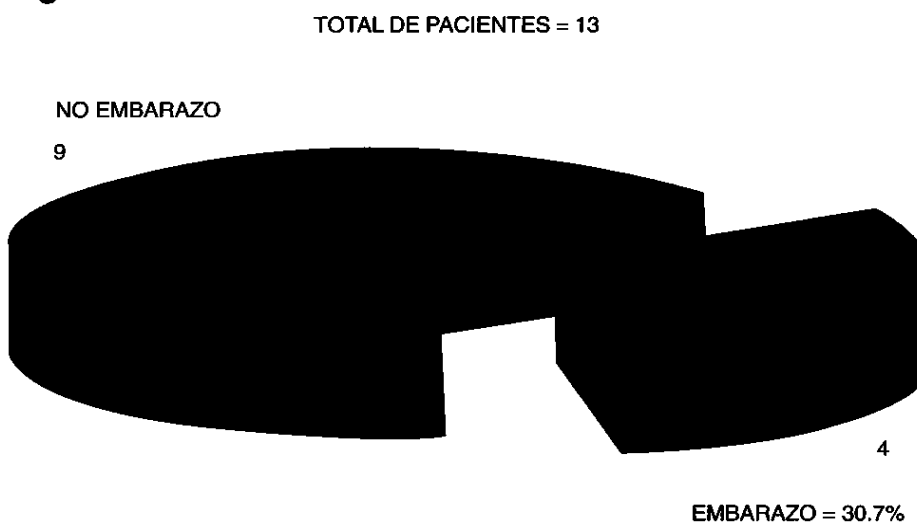
Con el empleo de estos medios de cultivo se han informado porcentajes de desarrollo de blastocistos de 50%^{10,27} y tasas de embarazo similares (50%). En nuestro estudio alcanzamos 40% de desarrollo de blastocistos con una menor tasa de implantación y con 30% de tasa de

Figura 2



Evolución de los blastocistos.

Figura 3



Porcentajes de embarazo.

embarazo por transferencia. Las mejores pacientes para ser sometidas a cultivos de blastocistos son aquellas con moderada a buena respuesta a la estimulación ovárica, por ej. > 10 folículos mayores de 12 mm el día de la aplicación de hCG²⁸ que es el grupo que está en riesgo de desarrollar embarazo múltiple.

No observamos ningún embarazo múltiple en nuestro estudio con un promedio de 2.1 blastocistos transferidos por paciente. Existen algunas clasificaciones de blastocistos en la literatura²⁹ y muchas otras personales no publicadas sin existir hasta el momento un consenso mayoritario al respecto.

Aunque nuestra casuística es poca, representa la experiencia inicial en el cultivo de preembriones humanos hasta etapa de blastocisto y el primer informe de uso de medios secuenciales en México. Existe lugar a discusión en cuanto al medio de cultivo utilizado, pues existen varios de distintos laboratorios. Aunque aparentemente existe la ventaja de algunos,²⁸ la mejor forma de comprobarlo es usarlos, adquiriendo experiencia con ellos. Existen informes de éxito con buenas tasas de embarazo con el medio que usamos en nuestro estudio³⁰ por

lo que es difícil para nosotros decir si es mejor uno u otro medio hasta no tener la experiencia de usarlos, aunque aparentemente, por el porcentaje de recuperación de los blastocistos en nuestro estudio (40%) —que no dista de lo informado en la literatura — pudiera inferirse que la tasa de implantación y de embarazos obtenida aquí, sea debida a una alteración en la implantación, ya sea por defecto en la suplementación con progesterona, por algún defecto intrínseco al endometrio, por el número de casos incluido en el estudio o por ser

nuestra experiencia inicial y siempre existe el temor de no tener al menos un blastocisto para transferir — mucho menos para congelar — después de cinco días de cultivo. Finalmente, creemos que se debe continuar el uso de estos medios en los programas de reproducción asistida en México con el afán de buscar la mejoría en las tasas de embarazo y finalmente, de recién nacidos vivos.

■ AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los biólogos Michael Tucker y Barry Behr su cooperación en la presente investigación.

■ REFERENCIAS

1. Menezo YJR, Guerin J-F, Czyba J-C. *Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of Vero cells*. Biol Reprod 1990; 42: 301-6.
2. Bolton VN, Wren ME, Parsons JH. *Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts*. Fertil Steril 1991; 55: 830-2.
3. Lopata A. *The neglected human blastocyst*. J Assist Reprod Genet 1992; 9: 509-12.
4. Oliiviennes F, Hazout A, Lelaidier C, et al. *Four indications for embryo transfer at the blastocysts stage*. Hum Reprod 1994; 9: 2367-73.
5. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. *A prospective randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization*. Fertil Steril 1996; 65: 1245-8.
6. Gardner DK, Lane M. *Culture and selection of variable blastocysts: a feasible proportion for human IVF?* Hum Reprod Update 1997; 3: 367-82.
7. Gardner DK, Lane M. *Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media*. Hum Reprod 1998; 13(Suppl 3): 148-59.
8. Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, et al. *Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to blastocyst*. J In Vitro Fertil Embryo Transf 1989; 6: 30-5.
9. Menezo Y, Hazout A, Dumant M, et al. *Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans*. Hum Reprod 1992; 7: 101-6.
10. Gardner DK, Vella P, Lane M, et al. *Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers*. Fertil Steril 1998; 69: 84-8.
11. Veeck L. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. Pearl River: Parthenon Publishing. 1999: 20-49.
12. Brinsden PR. *A Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Pearl River: Parthenon Publishing. 1999: 1.
13. Gardner DK, Lane M. *Embryo culture systems*. In: Trounson A, Gardner DK, eds. *Handbook of In Vitro Fertilization*. Boca Raton: CRC Press, 1993: 85-114.
14. Croxatto HB, Ortiz ME, Díaz S, et al. *Studies on the duration of egg transport by the human oviduct*. Am J Obstet Gynecol 1978; 132: 629-34.
15. Bavister BD. *Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts*. Hum Reprod Update 1995; 1: 91-148.
16. Gardner DK, Lane M, Calderon I, et al. *Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells*. Fertil Steril 1996; 65: 349-53.
17. Dale B, Menezo Y, Cohen J, et al. *Intracellular pH regulation in the human oocyte*. Hum Reprod 1998; 13: 964-70.
18. Edwards LE, Williams DA, Gardner DK. *Intracellular pH of the preimplantation mouse embryo: effects of extracellular pH and weak acids*. Mol Reprod Dev 1998; 50: 434-42.
19. Braude PR, Bolton VN, Moore S. *Human gene expression first occurs between the four- and eight-cells stages of preimplantation development*. Nature 1988; 332: 459-61.
20. Taylor DM, Ray PF, Ao A, et al. *Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cells stage*. Mol Reprod Dev 1997; 48: 442-8.
21. Lane M, Gardner DK. *Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro*. J Assist Reprod Genet 1997; 14: 398-403.
22. Lane M, Gardner DK. *Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions*. J Reprod Fertil 1994; 102: 305-12.
23. Lane M, Gardner DK. *Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids*. J Reprod Fertil 1997; 109: 153-64.
24. Gardner DK, Leese HJ. *Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro*. J Reprod Fertil 1990; 88: 361-8.
25. Gardner DK. *Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support*. Cell Biol Int 1994; 18: 1163-79.
26. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, et al. *Blastocyst development and pregnancy after in vitro maturation of human pri-*

-
- mary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995; 10: 3243-7.
27. Jones GM, Trounson A, Gardner DK, et al. Evolution of a culture protocol for succesful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169-77.
28. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, et al. A prospective randomized trial of blastocysts culture and transfer in in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
29. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 8: 2119-27.
30. Behr B, Pool TB, Milki AA, Gebhardt J, Dasing D. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 454-7.