

Autoanticuerpos dirigidos contra prolactina en pacientes con lupus eritematoso sistémico e hiperprolactinemia

DR. LEANDRO LEAÑOS MIRANDA,* DR. HÉCTOR HUGO BUSTOS LÓPEZ,**
DR. ANTONIO FRAGA MOURET***, DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA,*
M. EN C. DALILA PASCOE LIRA*.

RESUMEN

Encuestamos a pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) para detectar la presencia de macroprolactinemia y determinar su origen. De las muestras séricas obtenidas en 255 pacientes con LES en 37 (14.5%) se encontró hiperprolactinemia y éstas fueron tratadas con polietilenglicol y en once de 37 pacientes (29.7%) hubo una proporción significativamente alta de precipitación prolactina (PRL). Los estudios en filtración en gel revelaron que la big-big PRL (peso molecular mayor de 100 kDa) fue la forma predominante de la PRL sérica en estos pacientes y en ninguna mujer se encontró manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia como amenorrea y/o galactorrea. La naturaleza de la big-big PRL fue debida a un autoanticuerpo el cual se encontró como un complejo antígeno-anticuerpo (Ig-PRL). Estos datos sugieren que los pacientes con LES e hiperprolactinemia tiene una frecuencia muy alta de macroprolactinemia y que es debida a un autoanticuerpo anti-PRL, y que a pesar de la hiperprolactinemia no presentan las manifestaciones clínicas comunes a ella como amenorrea y/o galactorrea y ésta es una causa más que explica la alta frecuencia de hiperprolactinemia en pacientes con LES.

(Leaños, M.L. y col. *Autoanticuerpos dirigidos contra prolactina en pacientes con LES e hiperprolactinemia*. Ginec Obsi Mex 1998; 66: 179)

SUMMARY

We investigated patients with lupus erythematosus to detect the presence of hyperprolactinemia and to determine its origin. From the seric specimens obtained in 225 patients with LES, we found 37 (14.5%) with hyperprolactinemia and they were treated with polyethylenglicol, in 11 of 37 patients (29.7%) had a high significance of prolactin precipitation (PRL). The test in gel filtration shown the big-big PRL (Molecular weight >100kDa) was the predominant form from PRL serie in these patients and no woman had clinic effects of hyperprolactinemia as galactorrhea and/or amenorrhea. The big-big PRL essence was due to an antibody, with it was found like a immune complex (Ig-PRL). This evidence suggest the patients with LES and hyperprolactinemia have a very high incidence of macroprolactinemia relationated to antibodies anti-PRL, and in spite of the hyperprolactinemia not have clinical effects like amenorrhea and/or galactorrhea, and it is other cause to explain the high incidence of hyperprolactinemia in patients with LES. (Leanos, M.L. et al: *Auto-antibodies VS prolactin in SLE patients and hyperprolactinemia*. Ginec Obsi Mex 1998; 66: 179)

*Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS.

Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores, México, D.F., México.

**Instituto Nacional de Perinatología. Secretaría de Salud.

***Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI, IMSS.

Trabajo premiado, 1er. lugar Investigación básica, VII Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia, Querétaro, Qro.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad reumática autoinmune, es más frecuente en mujeres (relación mujeres/hombres 9:1) y más común durante la edad reproductiva¹, este predominio al sexo femenino ha sido atribuido a las propiedades inmunostimuladoras de los estrógenos². El LES tiene un espectro amplio de manifestaciones clínicas. La fisiopatología se caracteriza por anomalías en la respuesta inmune tanto en los linfocitos B como T, especialmente durante la actividad de la enfermedad causando una exagerada producción de autoanticuerpos. El suero de pacientes con LES se caracteriza por la reactividad a una gran variedad de autoantígenos, particularmente a nucleoproteínas, entre estos autoanticuerpos, aquellos que unen DNA, Sm, RNP, Ro, La e histonas han sido extensamente estudiados. Algunos autoanticuerpos como anti-DNA y anti-Sm muestran especificidad para LES, otros autoanticuerpos están asociados con manifestaciones particulares de la enfermedad.

Los niveles séricos elevados de prolactina (PRL) e incluso de hiperprolactinemia (HPRL) se han relacionado a múltiples alteraciones autoinmunes, como tiroiditis, uveítis, hipofisitis linfocítica, insuficiencia suprarrenal autoinmune y LES³⁻⁶. A partir de 1987 se ha encontrado en pacientes con LES niveles séricos elevados de PRL⁷⁻⁹ y la frecuencia de HPRL (≥ 20 ng/ml) en pacientes con LES oscila de 15.3% a 30%¹⁰⁻¹⁴ y sólo Ostendford¹⁵ ha informado una frecuencia de 2.2 %. En contraparte, sólo se espera que tengan hiperprolactinemia el 3% de las mujeres entre los 14 a 43 años de edad¹⁶.

Las causas de los niveles séricos elevados de PRL o de HPRL en pacientes con LES no son claras, en algunos se les ha detectado un adenoma hipofisario funcionante^{13,17}, en otros se les ha relacionado a causas bien aceptadas del aumento de la prolactinemia, como embarazo, medicamentos, insuficiencia renal, hipotiroidismo o alteraciones renales¹⁸; otros no se les encuentran causas que expliquen el incremento de la prolactinemia, en estos últimos puede ser que tengan microprolactinomas que no son identificados con las pruebas de diagnóstico disponibles o que su origen sea de órganos linfoides. Hattori encontró en algunos pacientes con HPRL idiopática y sin enfermedades autoinmunes la presencia de autoanticuerpos anti-PRL^{19,20} y que correlacionaron con una acción biológica débil de la PRL, es decir, sin alteraciones menstruales y/o galactorrea.

El LES es una enfermedad que se caracteriza por una respuesta inmune descontrolada cuya manifestación principal es la formación de múltiples autoanticuerpos, asimismo la HPRL es un fenómeno común en esta enfermedad y no presentan manifestaciones clínicas de la acción biológica de la PRL como trastornos menstruales y/o galactorrea; por lo que resulta razonable pensar que la hiperreactividad inmunológica en el LES se encuentre también dirigida hacia la PRL y que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL bloquee la acción biológica de la PRL. También podría explicar las causas que explique la HPRL en estos pacientes.

El objetivo del presente estudio fue demostrar la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra PRL y posteriormente evaluar en pacientes con LES la frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL, la relación que existe entre los

autoanticuerpos anti-PRL con el nivel sérico de PRL comparándolo con personas con hiperprolactinemia espontánea como mujeres embarazadas y evaluar la presencia de alteraciones secundarias a la PRL como alteraciones menstruales y/o galactorrea.

PACIENTES Y MÉTODOS

Los pacientes con edad igual o mayor de 16 años, con cuatro o más criterios del Colegio Americano de Reumatología para LES²¹ atendidos en forma consecutiva (muestreo no aleatorio) del 30 de septiembre de 1996 al 30 de abril de 1997 en el Servicio de Reumatología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social fueron elegibles para el estudio. A todos se les tomó una muestra de sangre entre las 09:00 a 13:00 horas y el suero se congeló a -35°C hasta la determinación de los estudios, además se les realizó historia clínica y exploración física y un interrogatorio enfático acerca de la presencia de galactorrea y en el caso de las mujeres sobre alteraciones en sus ciclos menstruales. Como control positivo de HPRL se tomaron muestras de once mujeres con embarazos normales y sin alteraciones.

Determinación de PRL. La concentración sérica de PRL fue medida por duplicado con dos sistemas, RIA con doble anticuerpo (DPC) e IRMA (Cisorin), los límites de sensibilidad de estas pruebas son de 1.5 ng/ml y 0.2 ng/ml respectivamente. Los sueros con HPRL (≥ 20 ng/ml) se les hizo extracción de PRL libre y total de acuerdo a los métodos usados para la extracción de insulina en los sueros con anticuerpos anti-insulina²². Para medir PRL libre, 200 µl de suero fueron incubados a 37 °C por dos horas y luego se agregó 200 µl de una solución de polietilenglicol (PEG 6,000) al 25%, esta mezcla fue agitada vigorosamente y centrifugada a 3,000 rpm a 4 °C durante 30 minutos, en el sobrenadante se determinó la concentración de PRL libre. Para medir PRL total, 50 µl de HCl IN se le agregaron a 400 µl de suero, después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregó 550 µl de PEG al 25% y la mezcla fue agitada vigorosamente, luego se agregó 100 µl de amortiguador 2 M TRIS-HCl (pH 8.3) para neutralizar el suero y finalmente la mezcla fue centrifugada a 3,000 rpm a 4 °C durante 30 minutos, en el sobrenadante se determinó la concentración de PRL total. Todos los estándares de los kits fueron tratados de igual manera.

Determinación de macroprolactinemia. Se determinó el porcentaje de macroprolactinemia mediante la siguiente fórmula: $(\text{PRL total} - \text{PRL libre} / \text{PRL total}) \times 100$. Dado que el PEG a la concentración final del 12.5 % precipita las fracciones de gammaglobulinas con peso molecular mayor de 100 kDa²³, la cantidad de PRL en el sobrenadante de la extracción libre se considera que esta libre de big-big PRL (> 100 kDa).

Unión a ¹²⁵I-PRL. Para determinar el porcentaje de unión a PRL marcada, 100 µl de suero fueron incubados con 25 µl de ¹²⁵I-PRL (15,000-20,000 cpm) durante una hora a 37 °C, después de la incubación se agregó 125 µl de PEG al 25% y la mezcla fue agitada vigorosamente y centrifugada a 3,000

rpm a 4 °C durante 30 minutos y el sedimento fue lavado una vez con PEG al 12.5% y nuevamente centrifugado, y la radioactividad fue medida por un minuto en un contador gamma.

Cromatografía de filtración en gel. La filtración en gel fue hecha en una columna de 1 x 70 cm de Sephadex G-100 equilibrada a 4 °C con 0.1 mol/L de PBS (pH 7.4) conteniendo 0.1% de NaN_3 y 0.1 % de albúmina sérica bovina. La columna fue calibrada con azul dextrán (volumen vacío), ^{125}I -IgG (150 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ^{125}I -PRL (23 kDa), citocromo C (12.4 kDa) y ^{125}I (volumen total). Un ml de suero fueron aplicadas a la columna y se recolectaron fracciones de 1.2 ml con un flujo de 7.2 ml por hora. La recuperación de PRL inmunorreactiva fue de 78 - 104 %.

Cromatografía de afinidad en gel con proteína A. Para confirmar que la proteína que se une a la PRL es una inmunoglobulina, se empleó una columna 1.2 ml con proteína A acoplada a sepharosa CL-4B (Sigma). Después de equilibrar la columna a 4 °C con 0.1 mol/L de PBS (pH 7.4), conteniendo 0.1% de NaN_3 , 200 μl de suero fueron aplicados a la columna y las proteínas no unidas fueron lavadas con el mismo amortiguador, luego el complejo Ig-PRL fue eluido con 1 mol/L de glicina-HCl (pH 2.7) y neutralizado inmediatamente con 1 mol/L TRIS-HCl (pH 9).

En el suero de 11 mujeres embarazadas sanas se les determinaron todas las pruebas anteriores para establecer los valores normales de referencia. Los coeficientes de variación intra como interensayo de todas las pruebas fueron menor de 8%.

Análisis estadístico. Se usaron frecuencias simples e intervalos de confianza al 95 % para estimar la proporción de los eventos de estudio. El ANOVA se utilizó para determinar diferencias entre variables continuas en tres grupos y la prueba de Scheffé para comparaciones a

posteriori y en caso necesario el ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis; y en la comparación de la variable continuas entre dos grupos se empleó la t de student para muestra independientes y la prueba de U de Mann-Whitney cuando era conveniente y la prueba exacta de Fisher para variables categóricas. La correlación entre PRL eluida de las fracciones ricas de inmunoglobulinas y de la PRL sérica se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (rs). El nivel de significancia fue $p < 0.05$ bimarginal en todos los casos.

RESULTADOS

Descripción general. Se estudiaron un total de 255 pacientes con LES, 238 eran mujeres (93.3%). Se identificaron a 37 pacientes con HPRL (14.5 %, IC 95% 10.2 - 18.8 %), en 14 de éstos se identificó una causa que explicara la HPRL (en cinco por medicamentos, en cuatro por nefropatía con depuración de creatinina $< 50 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ de superficie corporal, en dos por hipotiroidismo, en dos por embarazo y en uno por hepatopatía). El total de las mujeres embarazadas (100%) utilizadas como control positivo presentó hiperprolactinemia.

Presencia de macroprolactinemia. La proporción calculada acorde a la fórmula de: $\text{PRL directa} - \text{PRL libre} / \text{PRL directa} \times 100$ en las once mujeres embarazadas sanas fue de 11.7 ± 8.2 %, la cual fue probablemente no causada por big-big PRL, sino por una absorción inespecífica de la PRL al precipitado con PEG a 12.5 %, sin embargo las muestras séricas de los pacientes con LES con una relación mayor a la media + 3 desviaciones estándares (> 36.3 %) de estas mujeres embarazadas sanas fueron considerados que contenían una macroprolactinemia, bajo este criterio se identificaron a 11 pacientes con LES con macroprolactinemia (29.7%, IC 95% 15 - 44.4%). La frecuencia de macroprolactinemia en pacientes con LES y sin causa que explicara la HPRL fue de 9/23 (39.1 %, IC 95% 19.2 - 59 %) y en pacientes con LES e HPRL secundaria fue de 2/14 (14.3 %, IC 95 % 0 - 32.6%).

Tabla 1.

PORCENTAJE DE UNIÓN A PROLACTINA MARCADA Y DE LA RELACIÓN ENTRE LAS DIFERENTES EXTRACCIONES SÉRICAS DE LA PROLACTINA

Variable	LES			Valor de p
	Embarazadas	Sin MPRL	Con MPRL	
N	11	26	11	
Unión ^{125}I -PRL(%)	9.1 ± 2.0	16.1 ± 5.1	$22.1 \pm 7.3^*$	0.00001**
PRL directa por RIA/PRL directa por IRMA(%)	84.0 ± 11.2	85.1 ± 12.8	$51.5 \pm 18.0^*$	0.00001**
PRL directa por IRMA/PRL total por IRMA (%)	127.3 ± 16.3	119.2 ± 13.8	124.7 ± 27.6	0.17***
PRL directa por RIA/PRL total por RIA (%)	103.7 ± 16.2	111.3 ± 29.6	$76.0 \pm 47.1^*$	0.05***
PRL libre por IRMA/PRL total por IRMA (%)	114.6 ± 15.4	103.8 ± 14.8	$30.2 \pm 19.1^*$	0.00001**
PRL libre por RIA/PRL total por RIA (%)	98.7 ± 25.1	77.6 ± 22.5	$11.9 \pm 14.1^*$	0.00001**

* MPRL = macroprolactinemia

* $p < 0.05$ con MPRL vs sin MPRL y embarazadas sanas.

** ANOVA.

*** ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabla 2.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DETERMINACIONES DE LAS DIFERENTES EXTRACCIONES SÉRICAS DE PROLACTINA DE LOS PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Variable	LES		Valor de p
	Sin MPRL	Con MPRL	
N	26	11	
Edad en años	31.7 ± 10.8	29.7 ± 8.5	0.59 †
Mujeres	23	11	0.54 ‡
Evolución del LES en meses	79.5 ± 73.0	48.9 ± 35.8	0.68 ¶
PRL directa por RIA (ng/ml)	40.4 ± 23.0	32.5 ± 14.8	0.30 †
PRL directa por IRMA (ng/ml)	47.7 ± 28.4	77.1 ± 61.6	0.14 ¶
PRL libre por RIA (ng/ml)	26.3 ± 19.1	4.5 ± 3.5	0.00001 ¶
PRL libre por IRMA (ng/ml)	41.8 ± 24.8	13.8 ± 4.5	0.00001 ¶
PRL total por RIA (ng/ml)	65.1 ± 54.7	46.9 ± 38.1	0.44 ¶
PRL total por IRMA (ng/ml)	67.3 ± 52.1	48.4 ± 36.6	0.23 ¶

MPRL = Macroprolactinemia

† t student no pareada.

‡ Prueba exacta de Fisher

¶ U-Mann-Whitney.

Figura 1

Prolactina (ng/ml)

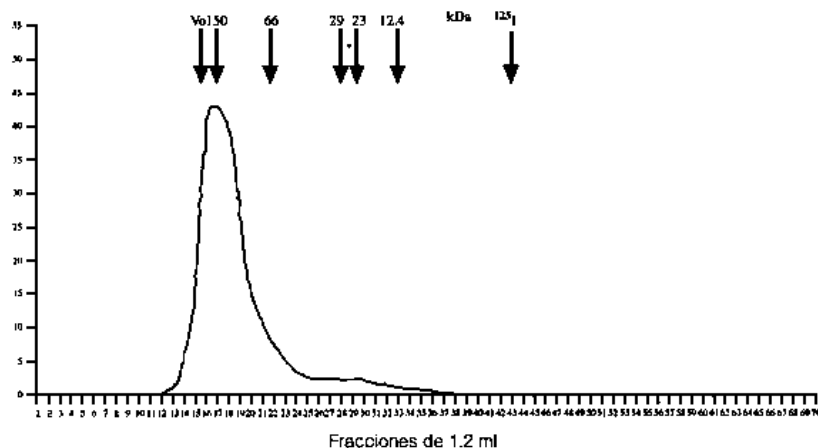
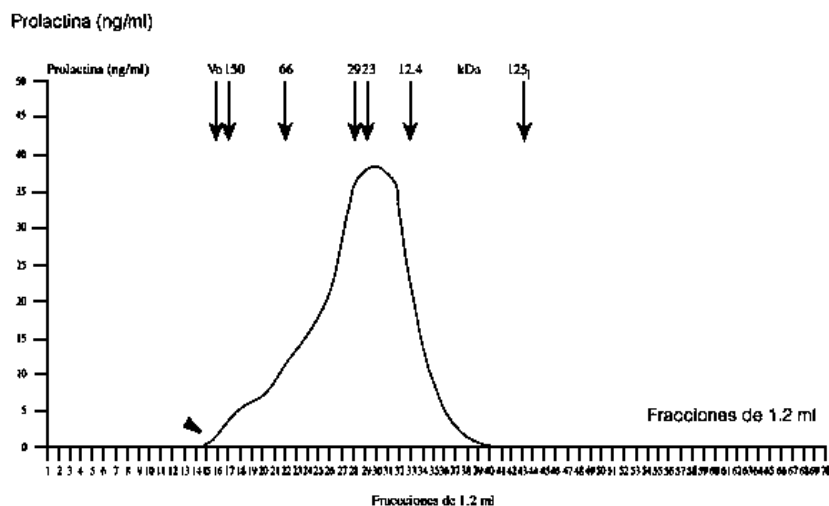
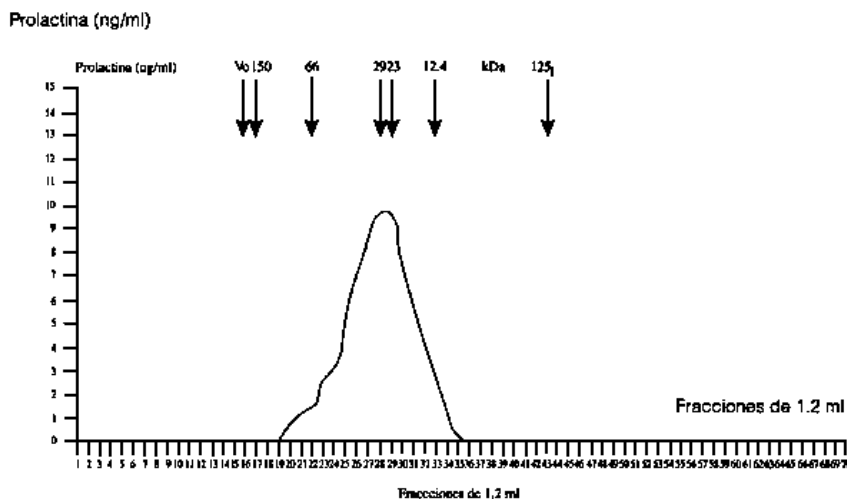


Figura 1. Perfil cromatográfico en gel representativo de la prolactina en una paciente con lupus eritematoso sistémico con autoanticuerpos anti-prolactina.

Porcentaje de unión a ^{125}I -PRL y de la determinación de PRL directa, libre y total. En la tabla 1 se muestra que el porcentaje de unión a la PRL marcada fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con macroprolactinemia ($p=0.00001$). En la tabla 1 se muestran la relación de las mediciones de PRL directa y de sus extracciones, en donde se encontró que los pacientes con

macroprolactinemia la PRL directa medida con RIA fue significativamente menor que la PRL directa por IRMA o total por RIA ($p \leq 0.05$), asimismo la PRL libre fue más baja significativamente que la PRL total determinada tanto por RIA como por IRMA ($p=0.00001$) y en cambio, la PRL directa y la PRL total por IRMA fueron semejantes ($p=0.17$).

Figura 2**Figura 2.** Perfil cromatográfico en gel representativo de la prolactina en una mujer embarazada sana.**Figura 3****Figura 3.** Perfil cromatográfico en gel representativo de la prolactina en una paciente con lupus eritematoso sistémico sin autoanticuerpos anti-prolactina.

Comparación entre pacientes lúpicos con y sin macroprolactinemia. La tabla 2 muestra algunas características clínicas y de las mediciones de las diferentes extracciones séricas de PRL, en donde se muestra que los pacientes con macroprolactinemia la determinación de PRL libre fue significativamente menor total por RIA como por IRMA ($p = 0.00001$), en cambio no hubo diferencia en cuanto a sexo, tiempo de evolución del LES y de las restantes extracciones séricas de la PRL.

Cromatografía de filtración en gel de los sueros con macroprolactinemia. La filtración en gel de los sueros

identificados con la presencia de macroprolactinemia con el método de precipitación con PEG mostró que la totalidad de la PRL o una cantidad substancial de ella fue eluida en la posición de pesos moleculares de 150 kDa (big-big PRL) en donde eluyó la ^{125}I -IgG, este patrón de elución difirió en los sueros sin macroprolactinemia determinada mediante el método de precipitación con PEG tanto en pacientes con LES como en las mujeres embarazadas sanas, en donde la PRL de estos pacientes eluyó en la posición de pesos moleculares de 23 kDa (little PRL). La figura 1-3 muestra los perfiles cromatográficos del suero de los pacientes con LES con y sin macroprolactinemia y de una mujer embarazada sana.

Figura 4

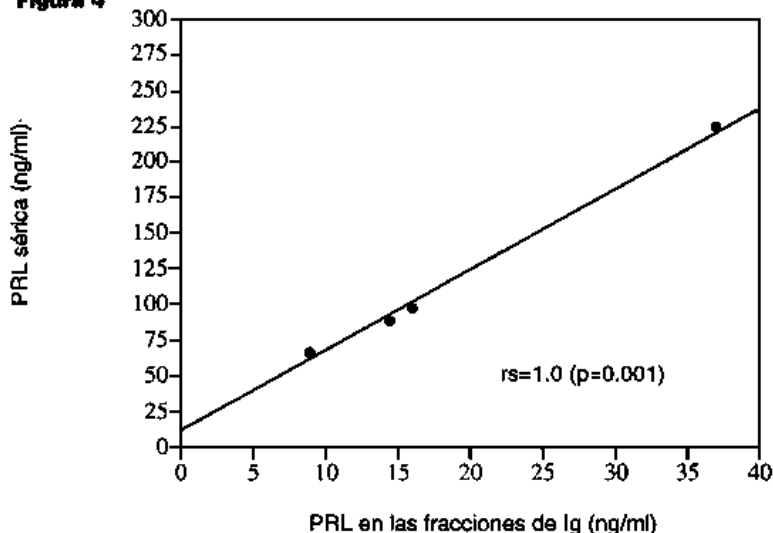


Figura 4. Correlación entre la PRL eluida en las fracciones ricas en inmunoglobulinas de la columna de afinidad con proteína A y los niveles de PRL sérica del suero de los pacientes con lupus eritematoso sistémico y autoanticuerpos anti-prolactina.

Tabla 3.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON HIPERPROLACTINEMIA Y AUTOANTICUERPOS ANTI-PROLACTINA

Paciente	Edad años	Sexo	Causa de hiperprolactinemia	Menstruación	Galactorrea	PRL ng/ml*	MPRL (%)**
1	19	F	Idiopática	Regular	No	68.6	88.1
2	17	F	Idiopática	Regular	No	34.9	54.7
3	36	F	Idiopática	Regular	No	136.0	85.8
4	43	F	Idiopática	Amenorrea‡	No	33.6	62.8
5	22	F	Drogas (clorpromacina)	Regular	No	44.0	58.4
6	29	F	Idiopática	Regular	No	90.5	76.5
7	27	F	Drogas (amitriptilina)	Regular	No	229.7	94.6
8	29	F	Idiopática	Regular	No	105.1	85.1
9	42	F	Idiopática	Histerectomía	No	31.8	71.4
10	33	F	Idiopática	Regular	No	42.6	77.5
11	30	F	Idiopática	Regular	No	31.1	67.2

*Prolactina directa por IRMA.

**PRL directa - PRL libre / PRL directa x 100 (por IRMA).

‡ Antecedente de dos ciclos de tratamiento con ciclofosfamida intravenoso por glomerulonefritis tipo IV.

Cromatografía por afinidad en gel con proteína A. El suero de cuatro pacientes con macroprolactinemia fueron pasados a una columna de proteína A y la PRL se determinó en las tres fracciones donde se encontró el pico máximo de absorbancia medido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. La correlación entre la PRL medida en las fracciones de la columna de proteína A y la de la determinación sérica de PRL directa por IRMA fue de $r_s = 1.0$ ($p = 0.0001$). Figura 4.

Presencia de trastornos menstruales y galactorrea en pacientes con LES y macroprolactinemia. Las características clínicas en cuanto a la presencia de galactorrea o trastornos menstruales de los pacientes con macroprolactinemia se muestran en la tabla 3. Todas fueron mujeres y sólo en una mujer de 43 años presentó amenorrea sin galactorrea, pero con el antecedente de haber recibido dos tratamientos con pulsos de ciclofosfamida intravenosa por glomerulonefritis lúpica tipo IV. Todas las demás sin trastornos menstruales y/o galactorrea, probablemente debido a la inactividad biológica de la PRL por la presencia de anticuerpos dirigidos contra esta hormona.

COMENTARIO

La frecuencia de macroprolactinemia en pacientes con LES e hiperprolactinemia fue de 29.7 % la cual consideramos muy alta. Este es el primer reporte que describe este fenómeno. En contraste, la frecuencia encontrada de hiperprolactinemia en pacientes con LES esta acorde con los reportes previos. La macroprolactina en estos pacientes suponemos esta formada por un complejo IgG-PRL (autoanticuerpo anti-PRL) sobre la base de los siguientes hechos: (i) el porcentaje de unión a ^{125} I-PRL fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con mayor prolactinemia (ii) el comportamiento de las mediciones de las diferentes extracciones séricas de la PRL es semejante a las informadas cuando están presentes los autoanticuerpos anti-PRL²⁴, es decir: 1) la PRL directa por RIA subestima la verdadera prolactinemia al compararla con la medición de PRL total por RIA como con la directa y total por IRMA, 2) valores semejantes entre PRL directa por IRMA, total por IRMA y total por RIA y 3) niveles de PRL libre tanto por RIA como por IRMA significativamente menores que la PRL total por RIA y que la directa y total por IRMA, (iii) la cromatografía de filtración en gel de estos sueros, la mayor parte de PRL inmunoreactiva estuvo en la posición del peso molecular de la IgG (150 kDa), y (iv) la detección de PRL en las fracciones de elución de las inmunoglobulinas mediante la cromatografía por afinidad a la proteína A.

La frecuencia de autoanticuerpos anti-PRL fue mas alta en los pacientes que no tenían causas probadas de hiperprolactinemia (39.1 %) que en los pacientes con causas probadas de hiperprolactinemia (14.3%), sugiere que la presencia de autoanticuerpos anti-PRL sea una causa más que explique la hiperprolactinemia en pacientes con LES. Esto es apoyado aún más por el hecho de que se encontró una correlación muy alta entre la PRL recuperada en las fraccio-

nes donde eluyen las inmunoglobulinas en la columna con proteína A y los niveles séricos de PRL directa mediante IRMA.

La causa de la presencia de los anticuerpos anti-PRL no es clara, se puede especular que la secreción de una PRL alterada o de su hipersecreción induzca la formación de autoanticuerpos anti-PRL por un mecanismo desconocido. Los niveles séricos de PRL pueden estar elevados por la presencia de autoanticuerpos anti-PRL por los siguientes dos mecanismos: 1) la PRL libre es fácilmente filtrada por el glómerulo, pero la PRL unida al anticuerpo y en virtud de su tamaño molecular escapa a la filtración glomerular y por lo tanto disminuyendo la degradación de la PRL por el riñón, un órgano importante para el catabolismo de la PRL^{25,26} y 2) la PRL juega un papel autorregulatorio en la hipófisis o hipotálamo, la PRL unida puede alterar estos mecanismos de autorregulación provocando hipersecreción de PRL. Los niveles elevados de PRL en pacientes con autoanticuerpos anti PRL puede ser análogo al síndrome autoinmune a la insulina, en la cual grandes cantidades de insulina son almacenadas y unidas a los anticuerpos anti-insulina^{27,28}.

El significado fisiológico de los autoanticuerpos anti-PRL además de incrementar la prolactinemia es atenuar la actividad biológica de la PRL, en 10 de las 11 mujeres que estudiamos no había alteraciones menstruales o galactorrea y sólo una con amenorrea sin galactorrea, pero esta paciente estuvo sometida a dos cursos de pulsos de ciclofosfamida intravenosa y el uso de este citotóxico es causa conocida de toxicidad gonadal y es probable que esta haya sido la causa de la amenorrea, al igual que nosotros Hattori también encontró ausencia de las manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia en las pacientes que el estudio con anticuerpos anti-PRL, lo anterior apoya la idea de que los autoanticuerpos anti-PRL bloqueen la acción biológica de la PRL en sus células blanco por interferir con la unión a su receptor o por la imposibilidad de llegar a ellas a través de la circulación sanguínea en virtud del tamaño molecular. La macroprolactinemia no relacionada a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL tiene muchas similitudes a la hiperprolactinemia relacionada a la presencia de autoanticuerpos anti-PRL, es decir, un peso molecular mayor a 100 kDa y la falta de manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia^{29,30}.

La hiperprolactinemia con niveles séricos de PRL mayores de 200 ng/ml es casi patognómica de prolactinoma³¹, nosotros sólo encontramos una paciente con un nivel sérico mayor de 200 ng/ml pero no tuvo evidencia de tumor hipofisario por TAC o resonancia magnética, de cualquier forma ante una paciente con PRL sérica mayor de 200 ng/ml, sin la presencia de lesión demostrada por TAC o RM y sin ausencia de manifestaciones clínicas o de niveles séricos de PRL menores de 200 ng/ml y sin manifestaciones clínicas de hiperprolactinemia o de causas probadas de ella se debe sospechar la presencia de autoanticuerpos anti-PRL.

Referencias

- Reeves WH, Lahita RG. *Clinical presentation of systemic lupus erythematosus in the adult*. In: Systemic Lupus Erythematosus. New York: John Wiley; 1987: 355-382.
- Inman RD. Immunologic sex differences and the female predominance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 819 - 852.
- Ferrari C, Bughen M, Parrachi A. Thyroid autoimmunity in hyperprolactinemic disorders. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 104: 35 - 41.
- Hedner LP, Bynke G. Endogenous iridocyclitis relieved during treatment with bromocriptine. *Am J Ophthalmol* 1985; 100: 618 - 619.
- Asa SL, Bilbao JM, Kovacs K, Josse RG, Kreines K. Lymphocytic hypophysitis of pregnancy resulting in hypopituitarism: A distinct clinicopathologic entity. *Ann Intern Med* 1981; 95: 166 - 171.
- Lever EG, McKerron CG. Auto-immune Addison's disease associated with hyperprolactinemia. *Clin Endocrinol* 1984; 21: 451 - 457.
- Lavalle C, Loyo E, Panagou R. Correlation study between prolactin and androgens in male patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14: 268 - 272.
- Folomeev M, Prokhaeva T, Nassonova V. Prolactin levels in men with SLE and RA. *J Rheumatol* 1990; 17: 1569 - 1570.
- Pauzner R, Urowitz MB, Gladman DD. Prolactin levels in systemic lupus erythematosus (abstr). *Arthritis Rheum* 1992; 35: S239.
- Jara LJ, Gomez-Sanchez C, Silveira I, H, Martinez-Osuna P, Vassey RB, Espinoza I, R. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus: Association with disease activity. *Am J Med Sci* 1992; 303: 222 - 226.
- Davis WE, Quinet R, Winters E, Cooper ES, Chambers R, Serebry L, et al. Serum interleukin 6 (IL-6) and prolactin (PRL) do not correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE) (abstr). *Lupus* 1995 (suppl 2); 4: 67.
- Buskila D, Lörber M, Neumann L, Flusser D, Shoenfeld Y. No correlation between prolactin levels and clinical activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 629 - 632.
- Pauzner R, Urowitz MB, Gladman DD, Cough J. Prolactin in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994; 21: 2064 - 2067.
- Noichant M. Elevated serum prolactin or elevated prolactin/cortisol ratio are associated with autoimmune processes in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1996; 23: 476 - 481.
- Ostendorf B, Fischer R, Santen R, Schmitz-Linneweber B, Specker Ch, Schneider M. Hyperprolactinemia in systemic lupus erythematosus? *Scand J Rheumatol* 1996; 25: 97 - 102.
- Batrinis ML, Panitsa-Paffia C, Tsigou E, Liapi C. Incidence and characteristics of microprolactinomas (3 - 5 mm) in 4199 women assayed for prolactin. *Horm Metab Res* 1992; 24: 384 - 391.
- McMurray RW, Allen SH, Braun AL, Rodriguez F, Walker SE. Logstanding hyperprolactinemia associated with systemic lupus erythematosus: Possible hormonal stimulation of an autoimmune disease. *J Rheumatol* 1994; 21: 843 - 850.
- Molitch ME. Pathologic hyperprolactinemia. *Endocrinol Metab Clin NA* 1992; 21: 877 - 901.
- Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 1226 - 1229.
- Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 438 - 445.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271 - 1277.
- Kuzuya H, Blix PM, Horwitz DL, Steiner DF, Rubenstein AH. Determination of free and total insulin and C-peptide in insulin-treated diabetics. *Diabetes* 1977; 26: 22 - 29.
- Schultze HE, Heremans JF. 1966 *Molecular biology of human proteins*. Elsevier; Amsterdam: 256.
- Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. *Eur J Endocrinol* 1994; 130: 434 - 437.
- Posner BI, Kelly PA, Shiu RPC, Friesen HG. Studies of insulin, growth hormone and binding prolactin: Tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 1974; 95: 521 - 531.
- Sievertsen GD, Lim VS, Nakawatase C, Frohman LA. Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and in patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 846 - 852.
- Hirata Y, Ishizu H, Ouchi N. Insulin autoimmunity in a case of spontaneous hypoglycemia. *J Jpn Diabetes Soc* 1970; 13: 312 - 320.
- Folling I, Norman N. Hyperglycemia, hypoglycemia attacks, and production of anti-insulin antibodies without previous known immunization: Immunological and functional studies in a patient. *Diabetes* 1972; 21: 814 - 826.
- Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53: 863 - 866.
- Larrea F, Escorza A, Valero A, Hernandez L, Cravioto MC, Diaz-Sanchez V. Heterogeneity of serum prolactin throughout the menstrual cycle and pregnancy in hyperprolactinemic women with normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68: 982 - 987.
- Kleinberg DL, Noel GL, Frantz AG. Galactorrhea: a study of 235 cases, including 48 with pituitary tumors. *N Engl J Med* 1977; 296: 589 - 600.

Estudio de la osteoporosis y osteopenia por medio de radiología, densitometría, morfometría y microscopia de barrido en la tercera vértebra lumbar en una muestra de hombres y mujeres en la ciudad de México.

*DRA. HILDA VILLEGAS CASTREJÓN, DRA. JOSEFINA MAYÓN GONZÁLEZ,
DRA. GUILLERMINA GONZÁLEZ MANCERA, DR. MARCO A. GONZÁLEZ JIMÉNEZ
DR. GILBERTO IBARRA MORA, DR. ALFONSO MURILLO URIBE,
DR. JAIME MORALES ARCE, DR. SAMUEL KARCHMER.*

RESUMEN

Objetivo. Determinar en la tercera vértebra lumbar de un grupo de hombres y mujeres de la Ciudad de México la densidad ósea estableciendo y correlacionando las características morfométricas del cuerpo vertebral, por medio de técnicas específicas y por detectar grupos con alteraciones de osteoporosis y osteopenia.

Metodología. El estudio se realizó en la tercera vértebra lumbar de 23 cadáveres del Servicio Médico Forense, 8 mujeres de 31 a 72 años y 15 hombres de 25 a 62 años. Los estudios efectuados fueron: radiológicos, densitometría ósea y análisis de imagen, en la que se determinó espesor de las trabéculas verticales y horizontales. Con microscopia electrónica de barrido por medio de la técnica de rayos X se determinó en forma semicuantitativa la presencia de calcio, fósforo, magnesio y sodio y en forma cualitativa la distribución de calcio en una área determinada del cuerpo vertebral mediante la técnica de energía dispersada de rayos X.

Resultados. Estudio radiológico en el grupo de mujeres ninguna vértebra estudiada fue normal, todas ellas presentaron cambios degenerativos, de éstas cinco con trabeculación aumentada y tres con evidencia de fractura, con respecto al grupo de hombres siete fueron normales y ocho casos con cambios degenerativos de éstos seis presentaron densidad ósea con densitometría con DEXA en el grupo de mujeres sólo una se determinó normal, tres osteopenia y cinco con osteoporosis, en el grupo de varones cinco fueron normales, cinco con osteopenia y cinco con osteoporosis. En la determinación del mapeo de calcio por medio del microscopio de barrido, se pudo observar la distribución de calcio, en los casos normales se observó su distribución en forma densa y homogénea, en los casos con osteoporosis esta distribución se presenta menos densa existiendo áreas en las que el calcio se encuentra disminuido o bien se encuentra ausente.

En el estudio morfométrico se determinó el espesor trabecular de nueve vértebras, de cinco mujeres y cuatro hombres, en el grupo de mujeres, una presentó un espesor trabecular promedio normal de 222.1 µm, en las cuatro restantes con osteoporosis el rango fue de 126.3 a 156.2 µm, en el grupo de varones se encontraron dos normales con un espesor trabecular promedio de 249.7 µm, en los dos casos restantes uno con osteopenia y otro con osteoporosis el valor promedio fue de 186.4 µm.

Instituto Nacional de Perinatología, México, D.F.

Trabajo premiado, 2do. lugar Investigación básica, VII Congreso Nacional de Ginecología y Obstetricia, Querétaro, Qro.

Conclusión. El estudio realizado en las 23 vértebras de hombres y mujeres se puede determinar que estos cambios degenerativos como son la osteopenia y la osteoporosis se están presentando en edades más tempranas que lo informado en la literatura, en teoría posiblemente las causas que lo estén originando sean factores de origen alimenticio, baja ingesta de calcio, falta de actividad física, étnico y genético.

(Villegas, C.H. y col. *Estudio de la osteoporosis y osteopenia por medio de radiología, densitometría y microscopía de barrido en la tercera vértebra lumbar en un muestra de hombres y mujeres en la ciudad de México.* Ginec Obst Mex 1998; 66: 187)

SUMMARY

Objective: To determine bone density in the third lumbar vertebra in a group of men and women from the Mexico City correlating the morphometric characteristics of vertebral body by specific techniques and to detect groups with alterations like osteoporosis or osteopenia.

Methodology: The study was made in third lumbar vertebra from 23 patients dead of the Medical Service Forense-México, 8 women between 31 to 72 years old and 15 men between 25 to 62 years old. The studies were: Radiological, bone densitometry and by image in which was determined density of vertical and horizontal trabeculae. With x-ray technique in scanning electron microscopy was determined in form semiquantitative the presence of Ca, P, Mg and Na, and Ca distribution by technique of x-ray energy dispersed.

Results: In the radiological trail all vertebrae of the female group were abnormal, the major finding was degenerative feature; 5 showed trabeculation increased 3 fractured; in the males group 7 patients were normal, degenerative fracture in 8; of these six had densitometry with DEXA; in the females group only one was normal, 3 osteopenia, 5 osteoporosis; in the male group: 5 osteopenia and 5 osteoporosis. Scanning electron microscopy examination exhibit a homogeneous and dense expression pattern, wherever SEM demonstrated the absence or decrease of deposit calcium in osteoporosis. A morphometric examination of the trabecular thickness demonstrates a difference between the two sexes. The normal median was 222.1µm, the osteoporosis range was 126.3 to 156.2µm in the female osteoporosis, in male group was found two normal values with a trabecular density mean of 249.7 µm, in the last two cases one with osteopenia and the other with osteoporosis, the mean value was 186.4µm.

Conclusions: In the present study, was demonstrated that the degenerative alterations in osteoporosis and osteopenia in young people are more frequent to respect other reports. The following observations require special emphasis either because they provide clues to the mechanism of altered expression of calcium: Genetic, ethnic, consume, sedentary and others. (Villegas, C.H. et al: *Radiologic, densitometry, morphometric and scanning electron microscopy study of osteoporosis or osteopenia of the third lumbar vertebra in female and male of the Mexico city.* Clinic Obst Mex 1998; 66: 87)

La osteoporosis es una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad en la vejez, definida como: enfermedad caracterizada por una disminución de la masa ósea y deterioro de la microarquitectura del tejido, que conduce al incremento de la fragilidad ósea y en consecuencia un aumento en el riesgo de fractura.^{1,2} Los expertos de la Organización Mundial de la Salud sugieren que operativamente sea definida como el nivel de densidad mineral ósea (DMO) en mujeres que caiga más de 2.5 desviaciones estándar (DE) por abajo de la media para jóvenes adultos saludables de 30 a 40 años de edad.^{2,4,5}

La incidencia y prevalencia de la osteoporosis aumenta con la edad y por la última definición en Estados Unidos se estima que 9.4 millones de mujeres blancas postmenopáusicas (30%) tienen osteoporosis en cadera, vértebra y antebrazo distal, aproximadamente 4.8 millones (16%) sufrirán fracturas por un traumatismo de bajo grado.⁵ Sólo 15% de mujeres de 50 a 59 años serán afectadas, pero este porcentaje aumenta dramáticamente con la edad para incluir 70% de mujeres de 80 años o más.^{2,4,5} 60% de este grupo ha experimentado una o más fracturas de la cadera,

vértebra, antebrazo distal, húmero proximal o pelvis. En Europa 23% de las mujeres mayores de 50 años o más tienen osteoporosis.⁵

Por la definición sugerida por la Organización Mundial de la Salud, en Estados Unidos una de nueve mujeres de 60 a 70 años tiene una densidad mineral ósea "normal", casi una de tres mujeres tiene osteoporosis y el resto tiene osteopenia. Así, 54% (16.8 millones) de todas las mujeres blancas postmenopáusicas en Estados Unidos tienen osteopenia y otro 30% (9.4 millones) tiene Osteoporosis y de este último el 50% ya tiene una fractura.²

De esta forma la osteoporosis es un problema de salud pública responsable de al menos 1.2 millones de fracturas cada año en Estados Unidos, los sitios de estas fracturas son: vértebras con 538 000 casos, cadera con 227 000 casos, antebrazo distal con 172 000 y otros sitios de los miembros 283 000 casos. Un tercio de mujeres de 65 años tendrán fractura vertebral por edad extrema, una de cada tres mujeres y una de cada seis hombres tendrán fractura de la cadera, este tipo de fractura es fatal en 12 a 20% de los casos.¹

La incidencia de fractura vertebral diagnosticada clínicamente fue para el año de 1992 en Estados Unidos de 7.3/10,000 personas-año en hombres y 14.5/10,000 personas-año en mujeres, la proporción femenina es substancialmente más alta entre las edades de 45 y 85 años.⁶

En nuestro País se ha logrado aumentar la esperanza de vida al nacer hasta 70 años, lo cual trae como consecuencia un incremento en la población de viejos,⁷ para 1988 el 11.3% de la población total fue mayor de 50 años y en un estudio del Hospital de Traumatología Magdalena de las Salinas del IMSS se estimó una frecuencia de fracturas de la cadera de 20 000 al año.⁸ En la República Mexicana para el año 1993 existían 3 014 532 personas mayores de 65 años y se calculó que para inicio del siglo XXI serán 4 820 634, esto representa un incremento de 37% de la población de ancianos, con base en estos datos se ha estimado que la población en riesgo de la osteoporosis es de 7.3 millones de mujeres mayores de 45 años y 1.2 millones de hombres mayores de 65 años lo que se espera que para el año 2000 estos grupos se incrementarán a 8.4 y 3.5 respectivamente.⁹ Así mismo estiman que para una población de 20 millones de habitantes del Valle de México un promedio de 25 000 fracturas en personas de 50 años o más con una franca tendencia al aumento.

La pérdida de masa ósea se considera un fenómeno del envejecimiento.^{9,10,12} El pico máximo de desarrollo de la masa ósea se alcanza en ambos sexos a la mitad de la tercera década de la vida y es de alrededor de 30% más alto en hombres que en mujeres. El 90% se acumula antes de los 20 años y el 10% restante entre los 30 y 35 años.^{9,11}

De acuerdo con Riggs y Melton¹ la osteoporosis involutiva se clasifica en: Tipo I (Postmenopáusica) cuando la disminución rápida de la masa ósea sigue a la supresión hormonal de estrógenos, afecta a mujeres de 51 a 75 años de edad (15 a 20 años después de la menopausia) la pérdida ósea es acelerada principalmente en el hueso trabecular, donde hay perforaciones de las láminas trabeculares con pérdida de la estructura trabecular, los sitios de fractura son: vértebras y antebrazo distal. La fractura vertebral es por aplastamiento o compresión asociada a dolor y deformación. La tipo II (Senil) cuando la disminución lenta de la masa ósea se da en la senectud, afecta a hombres y mujeres de más de 70 años de edad, los sitios de fractura más frecuentes son en cadera, vértebra, húmero proximal. La fractura vertebral es por cuña múltiple que conduce a la cifosis dorsal.

El objetivo de este trabajo es determinar en la población mexicana abierta, la densidad ósea en vértebra lumbar 3, establecer y correlaciona las características morfométricas del cuerpo vertebral por rayos X, densitometría ósea, microscopia óptica estereoscópica con sistema de análisis de imagen y por, microscopia de barrido.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material se obtuvo del Servicio Médico Forense, de individuos de ambos sexos, que murieron como resultado de: traumatismo craneo encefálico, heridas por proyectil de arma de fuego, infarto del miocardio, pancreatitis hemorrágica e intoxicación alcohólica, sin historia de en-

fermedad ósea aparente. El estudio comprendió 23 casos de autopsia, ocho mujeres de 31 a 80 años de edad (promedio de 56.6 años) y 15 hombres de 25 a 75 años de edad (promedio de 47.7 años). En este grupo por antecedentes familiares tres varones tenían antecedentes de alcoholismo. Se extrajo la tercera vértebra lumbar (L3) de cada autopsia, los especímenes se fijaron en formol al 10%, se disecaron retirando los restos de tejidos (muscular, adiposo y nervioso).

ESTUDIO RADIOLÓGICO.

Se obtuvieron proyecciones radiográficas de 23 cuerpos vertebrales (L3) en anteroposterior, lateral y axial con foco de 100 MA, 18 As y kv de 56 a 58. Con base en la imágenes obtenidas se realizó un análisis subjetivo para valor: Densidad ósea (con base en la experiencia del observador), grado de trabeculación, cambios degenerativos y evidencia de fractura. Para la densidad ósea se consideraron dos opciones: normal, si la densidad estaba conservada y disminuida, si la densidad ósea era menor. En relación a la trabeculación ósea se consideró dos opciones: normal, en caso de no apreciar alteraciones y aumentada, si se apreció prominencia y/o engrosamiento de las trabéculas. Para los cambios degenerativos consistentes en osteofitos y/o esclerosis se consignaron dos opciones: con o sin cambios degenerativos. La evidencia de fractura se obtiene por la altura del cuerpo vertebral en proyección lateral, midiendo este parámetro a nivel del borde anterior, parte media y borde posterior, si en alguno de ellos la altura es menor a 33% en relación con la medida mayor se presentan dos opciones con o sin evidencia de fractura.

ESTUDIO DENSITOMÉTRICO.

Se realizó fotodensitometría radiológica de doble fotón (DEXA) con haz de abanico con un equipo modelo Expert XL marca Lunar Corp. (Madison, Wisconsin) en el Centro para el Estudio del Climaterio y Osteoporosis, utilizando software de pequeñas partes para el uso en investigación. Esta equipo tiene un coeficiente de variación de 0.3% (n:312) en el análisis diario de control de calidad.

Las vértebras se colocaron en un recipiente plástico con gelatina como ventana radiológica de densidad neutra para mantenerlas fijas durante el rastreo. Los bordes vertebrales (ROI) se delimitaron en forma estándar en el contorno del hueso. EL resultado cuantificado es la densidad mineral ósea (DMO) expresado en g/cm².

ESTUDIO MORFOMÉTRICO.

A cada vértebra se le practicaron dos cortes frontales a partir del centro del cuerpo vertebral de 3 a 5 mm de espesor, a uno de estos cortes a su vez se fragmentó en forma longitudinal en cuatro porciones iguales, un fragmento se destinó para el estudio e microscopio electrónica de barrido convencional, y un corte frontal completo para la medición de del espesor trabecular en el microscopio estereoscópico con sistema analizador de imágenes.

ESTUDIO CON EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO AMBIENTAL.

Con el fin de demostrar los beneficios, la información que

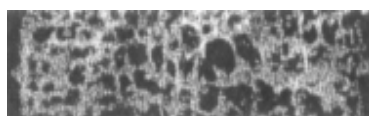
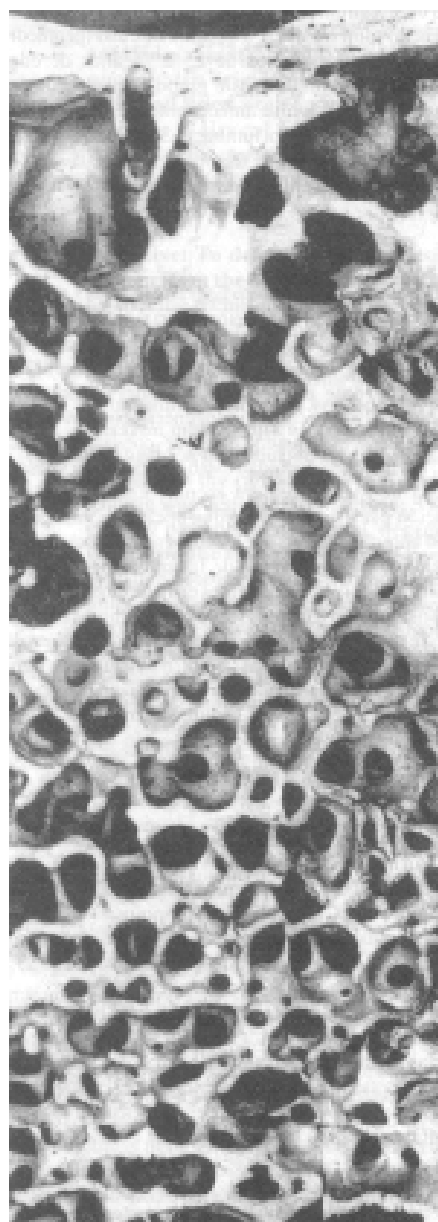


Fig. 1a. Imagen de hueso cortical y/o esponjoso, en el que el mapeo, los iones de calcio presentaron una distribución densa y homogénea.

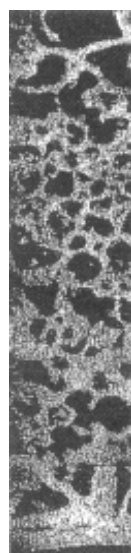


Fig. 1b. Se observa la disposición de trabéculas verticales (▲) y Horizontales (⊥) en un cuerpo vertical normal. La figura de la izq. es un aumento de la zona que se muestreó.

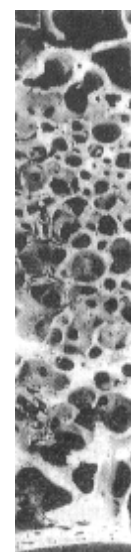


Figura 1.

se puede obtener y el ahorro de tiempo en procesar una muestra para el microscopio de barrido convencional, al azar se escogió un corte frontal de vértebral lumbar de 25 mm de ancho por 45 mm de largo y un espesor de 5 mm, sin descalcificar y libre de médula ósea. Esta muestra sin ningún otro proceso se observó en el microscopio electrónico ambiental de barrido Philips XL 30-CP de alto y bajo

vacío con analizador EDAX DX4 y software. Las áreas observadas fueron de 3 por 4 mm localizadas en el cuadrante superior derecho del corte, a estas zonas se les realizó un mapeo para calcio, se muestra la topografía en la fig. 1, observar la imagen obtenida por electrones retrodispersados en la fig. 2, notar la resolución y los detalles que se pueden obtener en con este equipo.



Fig. 2. La resolución más fina de un microscopio de barrido, permite identificar con precisión cualquier detalle del hueso aquí son evidentes los orificios de los capilares de los conductos de Havers (▲)

ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y DETERMINACIÓN DE CALCIO.

Un fragmento del corte frontal del cuerpo vertebral se utilizó para el estudio de microscopía electrónica de barrido, el tamaño de esta muestra fue de 2 cm de largo por 1 cm de ancho, se lavaron con agua, se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, se deshidrataron en alcoholes graduales y posteriormente se colocaron en una mezcla de alcohol absoluto y acetona en una proporción 1:1 durante dos horas. Las muestras se montaron en cilindros metálicos sobre una cinta conductora de carbón debidamente etiquetadas, se cubrieron con grafito y plata en una evaporadora de metales Jeol. Se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol, se tomaron micrografías electrónicas de las muestras mediante la señal de electrones secundarios. Para la determinación de la composición química (magnesio, fósforo, calcio y sodio) se analizaron zonas al azar en la parte superior, media e inferior de las muestras, para esto se utilizó la señal de rayos X para el microanálisis químico. Se realizaron mapas de calcio por medio del espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS) modelo Ortec sistema 5000.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO CON MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO Y EL SISTEMA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES.
Se escogieron al azar nueve cortes frontales de diferentes

vértebras L3 de aproximadamente 3 o 4 mm de espesor, sin descalcificar, se lavaron cuidadosamente con agua caliente para retirar la médula ósea y el tejido adiposo. Se les efectuaron mediciones del espesor y longitud de las trabéculas óseas, en un sistema analizador de imágenes asistido por computadora "Zeiss Image" versión 3.00 para Windows 95/NT, Stereomicroscopio Carl Zeiss modelo SV-11 con iluminación de halógeno 6V, 10W, por medio de luz reflejada con lente Plan IX, las imágenes se capturaron a 60X, escala en mm, con una cámara de televisión Sony DXC 151A, con tecnología CCD.

Para cada caso se dividió la superficie en ocho partes iguales, cuatro superiores y cuatro inferiores, se eligieron dos zonas (una medial superior izquierda y una lateral inferior derecha) se realizaron de 8 a 10 mediciones en cada zona, en total por corte frontal se realizaron 16 a 20 mediciones. Cada zona se dividió en tercios y se realizaron las mediciones de trabéculas horizontales y verticales en espesor. Se delinearon los límites longitudinales de cada trabécula y se determinó el espesor al obtener la media del valor mínimo y el máximo de cada trabécula medida. En todas las muestras analizadas se tomaron fotografías.

RESULTADOS ESTUDIO RADIOLÓGICO

Los resultados del estudio radiológico que se realizó en 15

Tabla 1.

Correlación del estudio de rayos X, densitometría ósea con edad, talla y peso en mujeres

Edad	Talla (cm)	Peso (kg)	Hallazgos radiológicos				DMO (g/cm ²)
			Densidad ósea	Trabeculación	Evidencia de FX	Cambios degenerativos	
31	160	63	D	N	No	Si	1.114 /N
40	152	41	N	N	No	Si	0.934 /OPN
45	164	68	D	A	Si	Si	0.773 /OP
48	160	69	D	A	Si	Si	0.618 /OP
66	173	78	D	A	No	Si	0.358 /OP
70	145	60	D	A	No	Si	0.958 /OPN
72	150	60	D	A	No	Si	0.625 /OP
80	150	54	D	N	Si	Si	0.934 /OPN

DMO = Densidad Mineral Ósea

D = Disminuida

A = Aumentada

Fx = fractura

N = Normal

OPN = Osteopenia

OP = Osteoporosis

Tabla 2.

Correlación del estudio de rayos X, densitometría ósea con edad, talla y peso en hombres.

Edad	Talla (cm)	Peso (kg)	Hallazgos radiológicos				DMO (g/cm ²)
			Densidad ósea	Trabeculación	Evidencia de FX	Cambios degenerativos	
25	170	72	N	N	No	Si	0.726 /OPN
28	157	53	N	N	No	No	1.063 /N
28	171	56	N	N	No	No	0.638 /OP
30	190	74	N	N	No	No	1.102 /N
45	169	65	N	N	No	No	0.656 /OP
46	168	74	N	N	No	No	1.249 /N
47	164	82	D	A	No	Si	0.741 /OPN
47	169	70	N	N	No	No	0.641 /OP
50	158	60	D	N	No	Si	0.776 /OPN
51	162	80	D	A	Si	Si	0.889 /OPN
55	159	67	D	N	No	Si	0.966 /N
55	154	55	N	N	No	No	1.245 /N
62	166	75	N	N	No	Si	0.868 /OPN
72	168	70	D	A	No	Si	0.573 /OP
75	153	45	D	N	No	Si	0.644 /OP

DMO=Densidad Mineral Ósea

D=Disminuida

A=Aumentada

Fx=fractura

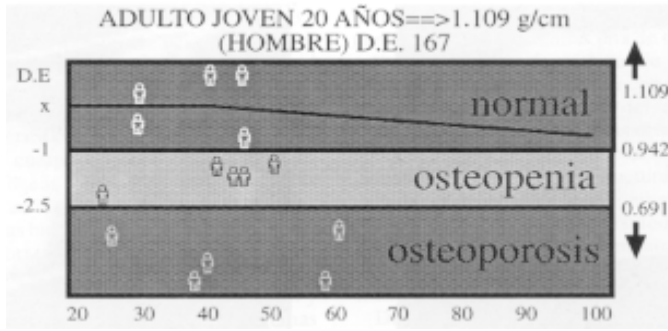
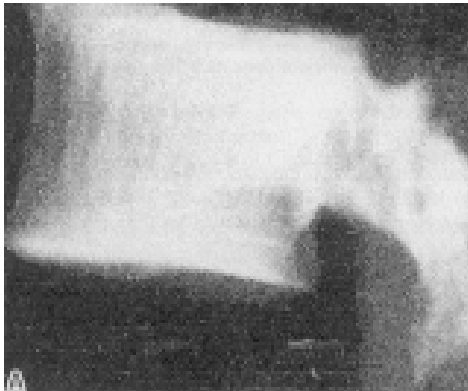
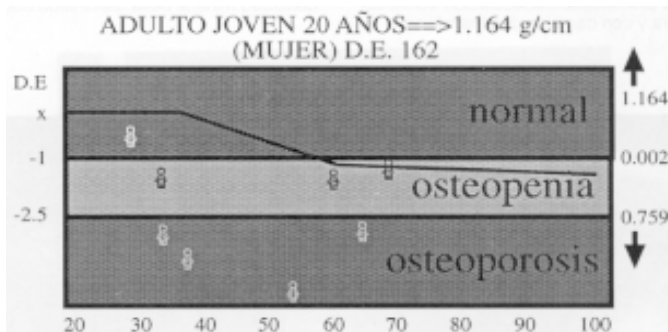
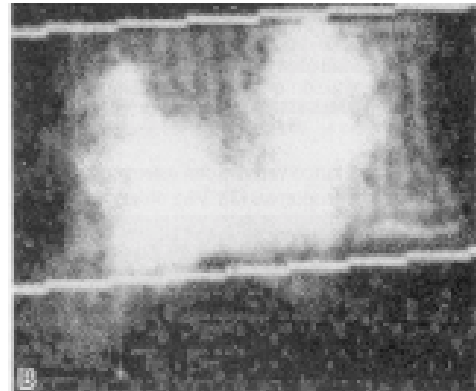
N=Normal

OPN=Osteopenia

OP=Osteoporosis

hombres y ocho mujeres a través de un análisis de proyecciones radiográficas de la tercera vértebra lumbar en posiciones anteroposterior lateral y axial se muestran en la tabla No. 1 y 2. En el grupo de las mujeres con una edad promedio de 56.6 años y con una talla y peso promedios de 156.7 cm y 61.5 kg respectivamente, se observó que ninguna vértebra L3 de las ocho estudiadas presentó los cuatro parámetros radiológicos normales, es decir, con densidad ósea y trabeculación normal, así como sin evidencia de fractura ni cambios degenerativos. En relación a los datos radiológicos por separado: la densidad ósea fue normal en 12.5% (una mujer) y disminuida en 87.5% (siete mujeres); la trabeculación aumentada en 62.5% (cinco mujeres) y normal en el 37.5%

(tres mujeres); con respecto a la evidencia de fractura en 37.5% (tres mujeres) y sin evidencia de fractura en 62.5% (cinco mujeres) y en el último parámetro 100% de este grupo presentó cambios degenerativos. En el grupo de varones con una edad promedio de 47.7 años y una talla y peso promedios de 165.2 cm y 66.5 kg respectivamente, se observó que 46.6% (siete hombres) presentó los cuatro parámetros radiológicos normales. En relación a los parámetros radiológicos por separado: la densidad ósea disminuida en 40% (seis hombres) y normal en 60% (9 hombres); la trabeculación fue normal en 20% (tres hombres) y aumentada en 80% (12 hombres); con evidencia de fractura en 6.6% (un hombre) y sin evidencia de fractura en 93.3% (catorce hombres) y en

Gráfica 1

Gráfica 2

Fig. 3a. Toma lateral por rayos X en una vértebra L3 con densidad y traeculación normal, sin evidencia de fractura ni cambios degenerativos

Fig. 3b. Análisis densitométrico en una vértebra L3 normal con una densidad mineral ósea de 1.24 g/cm²

relación a los cambios degenerativos presentes en 53.3% (ocho hombres) y ausentes en 46.6% (siete hombres).

ESTUDIO DENSITOMÉTRICO

El estudio densitométrico es un procedimiento seguro, no invasivo y se puede definir con cierta exactitud los cambios en la densidad ósea.

En los resultados obtenidos en las 23 vértebras L3 con la fotodensitometría radiológica de doble fotón se pudo determinar la densidad mineral ósea, se encontró que en grupo de mujeres solamente una de 31 años fue normal (12.6%) con 1.114 g/cm² de DMO, tres mujeres con osteopenia (37.5%) y cuatro mujeres con osteoporosis (50%); en el grupo de varones cinco de ellos fueron normales (33.3%) con una DMO prome-

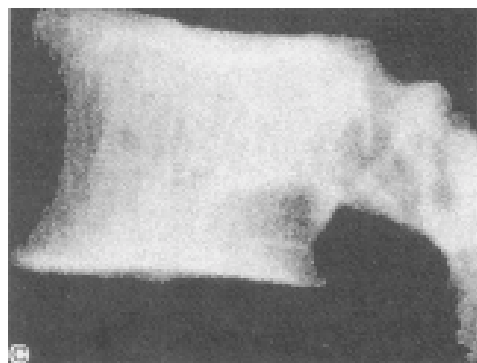


Fig. 3c. Toma lateral por rayos X en una vértebra L3 con osteopenia. densidad ósea disminuida, trabeculación aumentada con ligera disminución en altura, sin evidencia de fractura y con cambios degenerativos.

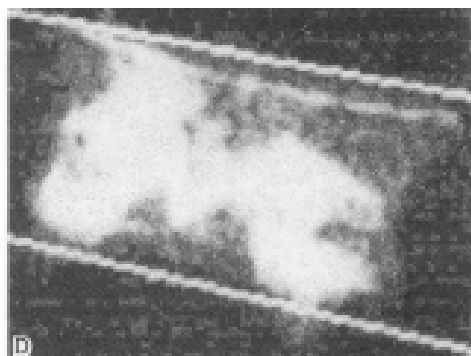


Fig. 3d. Análisis densitométrico en una vértebra L3 con osteopenia densidad mineral ósea disminuida con 0.726 g/cm²

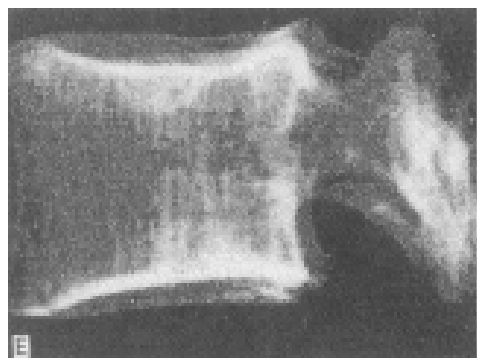


Fig. 3e. Toma lateral por rayos X en una vértebra L3 con osteoporosis. Densidad ósea disminuida trabeculación aumentada con ligera disminución en altura en la parte posterior con cambios degenerativos

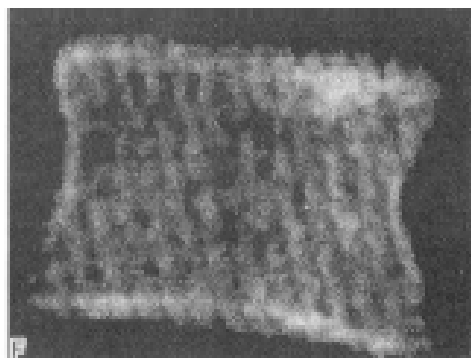


Fig. 3f. Análisis densitométrico en una vértebra L3 con osteoporosis con densidad mineral ósea de 0.358 g/cm²

dio de 1.125 g/cm², cinco varones con osteopenia (33.3%) y cinco de ellos con osteoporosis (33.3%), observar las gráficas 1 y 2 y fig. 3.

En relación con la edad de los varones diagnosticados con osteopenia tres de ellos tenían antecedentes de alcoholismo, llamando la atención que la edad de un varón era de 25 años y en el análisis del grupo con osteoporosis en varones, se encontraron tres menores de 50 años en ellos no fue posible obtener de los familiares información acerca de sus antecedentes de patología asociadas.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO:

Estudio por microscopía electrónica de barrido y determinación de calcio.

Se realizó un análisis puntual para la determinación de la composición química en tres puntos de los fragmentos de vértebras: superior, medio e inferior, de siete mujeres y nueve hombres. Los elementos más abundantes determinados porcentualmente fueron calcio y fósforo, lo más abundantes independientemente de la edad y sexo, tomar en cuenta que este análisis al ser puntual no refleja la totalidad de cualquier

elemento presente en la muestra completa. En mujeres el calcio varió de 63% a 73.25% y el fósforo de 23.4% a 34.4.9%. En hombres el rango de calcio fue de 64.4% a 79.89% y el fósforo de 17.09% a 32.9%. Otros elementos se pudieron detectar en algunos casos como el magnesio y el sodio, estos siempre se presentaron en menor cantidad, en mujeres el magnesio va de 2.4% a 1.03% y el sodio de 3.75% a 2.06%; en hombres el magnesio fue de 1.09% a 1.41% y el sodio de 2.23% a 4.58%. En el caso de que estos dos últimos elementos no se pudieron detectar fue porque se encontró en poca cantidad siendo imposible detectarlos con el aparato. En la fig. 4a se muestra un mapeo de calcio determinado por la técnica de energía dispersa de rayos x, en esta imagen se pueden apreciar a la izquierda un fragmento de vértebra de una mujer de 40 años en la cual se observa la presencia de trabéculas disminuidas en espesor, así como la presencia de estructuras en las cuales se ha depositado calcio en forma anormal debido a la fractura, a esta misma zona se le realizó un mapeo de calcio en la que se observa la distribución de este elemento en forma más densa en las partes superficiales, en estas mismas zonas se presentan pequeñas áreas en las cuales el calcio se encuentra disminuido,

comparativamente se muestra la trabécula de una mujer de 31 años en la cual se aprecia la distribución de calcio en una forma más densa y homogénea, fig. 4b.

ESTUDIO MORFOMÉTRICO CON MICROSCOPIO

ESTEREOSCÓPICO Y EL SISTEMA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES.

La estructura básica del cuerpo vertebral normal consiste en láminas o placas óseas onduladas con pequeñas fenestraciones que limitan espacios medulares, la orientación de estas láminas (más bien que trabéculas) es predominantemente vertical y horizontal, en las regiones cercanas a las superficies superior e inferior del cuerpo vertebral, estas estructuras son más densas que en la parte central y esto se debe al aumento en el espesor de las láminas horizontales y su arreglo más cercano particularmente a nivel de la parte central inferior, en la parte superior las

láminas tienen una disposición aproximadamente radial y también son más cercanas una de otra, fig. 5a.

El análisis morfométrico de la microarquitectura trabecular ha demostrado que con la edad la pérdida de la masa ósea es el resultado del adelgazamiento de las trabéculas horizontales. En las observaciones cualitativas, las trabéculas en forma de placas o láminas en la gente joven son los elementos estructurales predominantes.

En las vértebras que correspondieron a personas mayores de 60 años se observó que casi todas las trabéculas consideradas como placas se habían transformado en trabéculas delgadas formando una arquitectura con mayores espacios medulares, fig. 5b.

De las 23 vértebras que se les efectuó el estudio radiológico y densitométrico, se escogieron al azar nueve vértebras, de las que se obtuvo un corte frontal sin descalcificar, se

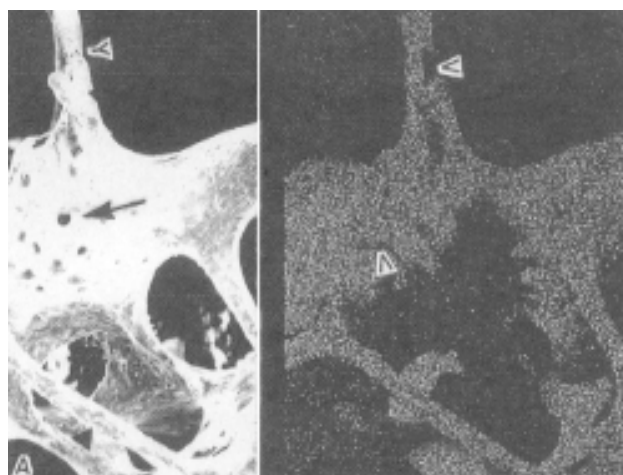


Fig. 4a. A la izq. se presenta un cuerpo vertebral de una mujer de 48 años se aprecian trabéculas adelgazadas (▲) y la presencia de un posible callo debido a una fractura (↑), a la derecha mapeo de la distribución de calcio de la misma zona, se presentaron áreas en la que se observa la disminución o pérdidas de calcio (↑) 50x

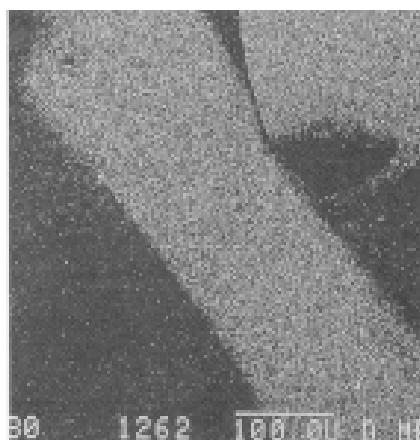


Fig. 4b. A la izq. trabécula de una mujer de 31 años sin alteraciones. a la derecha se presenta un mapeo de calcio de la misma zona, la distribución es homogénea y abundante 180x.

efectuaron de 16 a 20 mediciones del espesor trabecular en cada corte frontal de vértebra, de acuerdo a lo establecido en material y métodos. El motivo de haber analizado un grupo muy reducido se debió a que este estudio se realizó con un equipo prestado por la Compañía Zeiss, sin embargo, se pudo llevar a cabo las mediciones en tres vértebras normales: dos hombres de 28 y 46 años y una mujer de 31 años; una vértebra con osteopenia: un hombre de 62 años y cinco vértebras con osteoporosis: cuatro mujeres de 45, 48, 66 y 72 años y un hombre de 47 años, ver fig. 6a, b y 7a. Al analizar las tablas de resultados 3 y 4, se observa que los varones y la mujer normalmente fueron menores de 50 años y los valores del espesor trabecular promedio en los varones fue muy similar (248.7 y 249.7 μm) y el de la mujer fue ligeramente menor

(222.1 μm). Sólo un espécimen de los estudiados presenta osteopenia por densitometría y corresponde a un varón mayor de 50 años con un espesor trabecular promedio de 185.5% y finalmente el grupo de osteoporosis un hombre menor de 50 años con un espesor trabecular promedio de 186.4 μm y cuatro mujeres: dos menores de 50 años con un espesor trabecular promedio de 126.5 y 143.5 μm y dos mayores de 50 años con un espesor trabecular promedio de 154.2 y 143.5 μm . Los resultados obtenidos se muestra en las tablas 3 y 4.

En varios casos analizados las trabéculas presentaron una discontinuidad terminando en forma libre como lo muestra la fig. 7b. Esta pérdida de unión es incapaz de proveer una estabilidad en esa zona. Este tipo de rompimientos se observó en vértebras de personas mayores de 60 años.

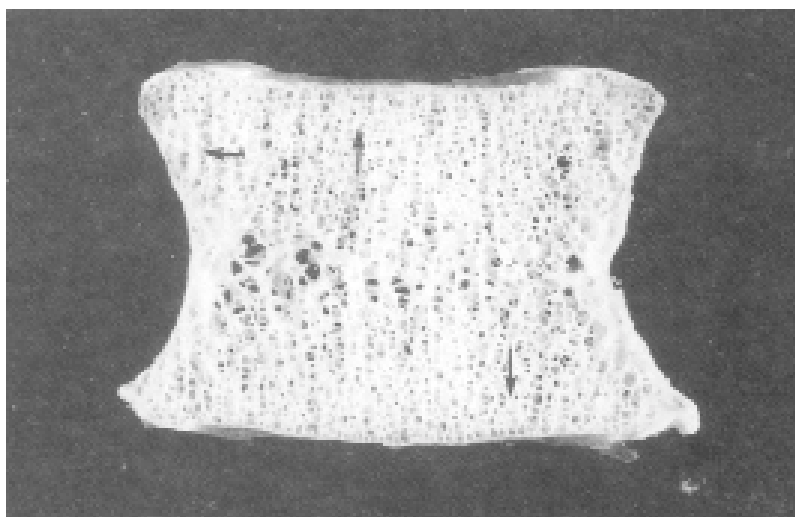


Fig. 5a. Corte frontal de una vértebra L3 normal con un espesor de 3 mm. Observese la distribución en forma regular de las trabéculas verticales y horizontales con una densidad mayor en zonas cercanas al periostio (↑).

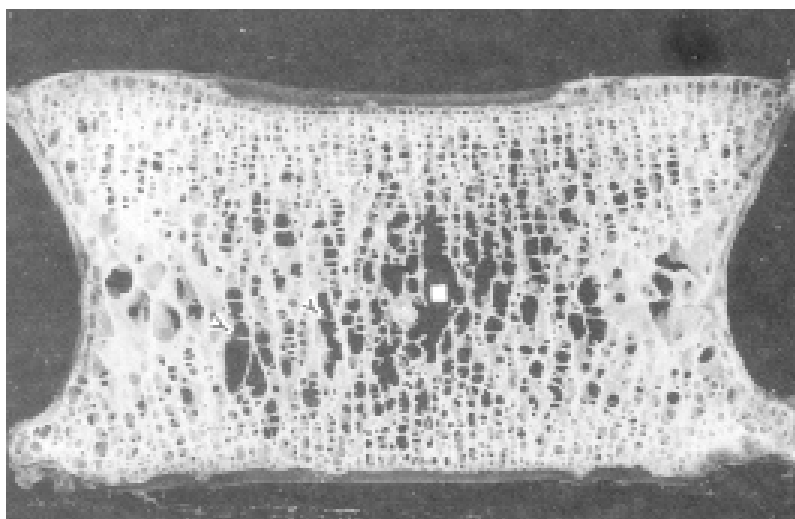


Fig. 5b. Corte frontal de una vértebra L3 observe la pérdida de trabéculas horizontales (↑). Las trabéculas horizontales de encuentran disminuidas en su grosor (↑↑) la pérdida de trabéculas verticales y horizontales forman espacios medulares de mayor tamaño (■).

COMENTARIO

La osteoporosis es un problema de salud pública y en Estados Unidos se ha estimado que 9.4 millones de mujeres blancas postmenopáusicas tienen osteoporosis y que cerca de 4.8 millones han tenido una fractura. En Europa se ha informado que cerca de 23% de mujeres en la quinta década de su vida tienen osteoporosis;²² sin embargo existen pocos reportes en relación con la incidencia de fracturas vertebrales. En un estudio en Rochester la incidencia de fracturas fue de 7.3/10000 personas en varones por año y de 14.5/10000 personas en mujeres por año.²³

En nuestro país son muy escasos los informes epidemiológicos de fracturas de la columna vertebral por osteoporosis²⁴ y la mayoría de la información disponible está relacio-

nada con pacientes hospitalizados, que presentan fracturas osteoporóticas de cadera y estos estudios se han hecho debido a que es más fácil identificar la población a estudiar.²⁵⁻²⁶

Nuestro reporte por tratarse de una población abierta, en donde se desconoce cualquier antecedente de patología que pudiera estar relacionada con la pérdida de calcio, hipogonadismo, ooforectomía, menopausia temprana o aspectos genéticos, no se hará ningún comentario o conclusión en relación con aspectos clínicos.

La causa de muerte del grupo estudiado fue por muerte súbita, debido principalmente a traumatismos craneoencefálicos, heridas por proyectil de arma de fuego, infarto del miocardio, pancreatitis aguda e intoxicación alcohólica.

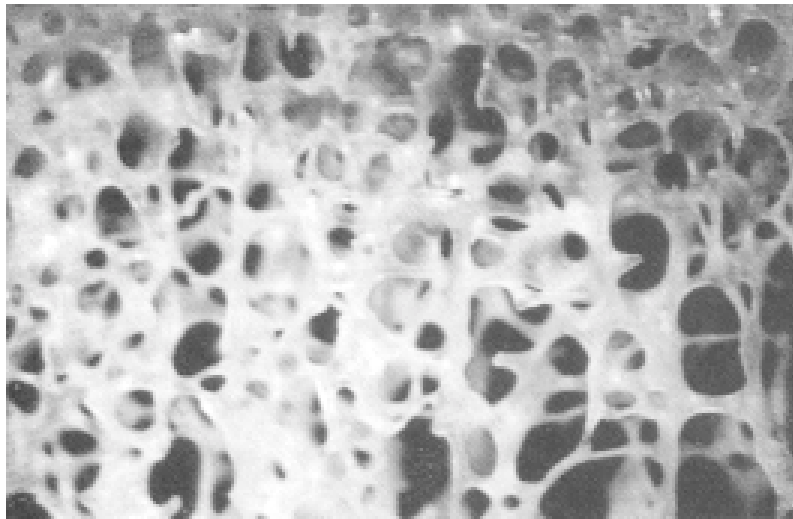


Fig. 6a. Corte frontal de una vértebra L3 normal en donde se señalan las mediciones de las trabéculas horizontales y verticales, efectuadas con un analizador de imágenes en una mujer de 31 años. El espesor trabecular promedio fue de 222.1 micras.

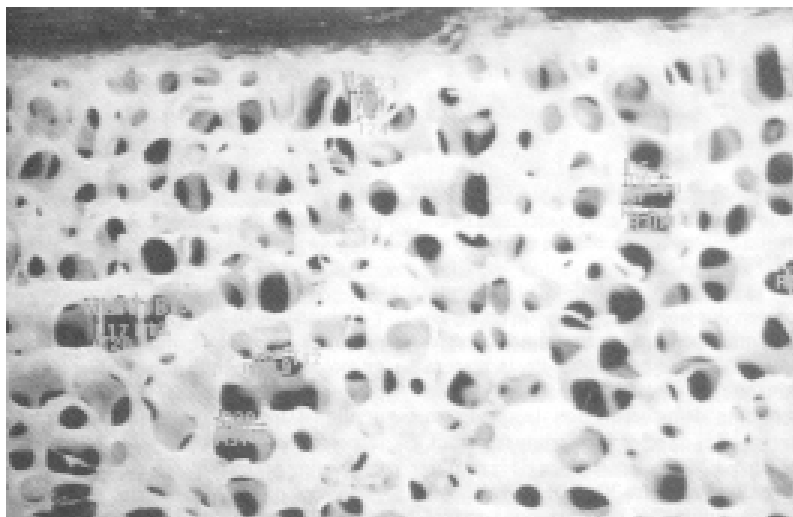


Fig. 6b. Corte frontal de una vértebra L3 en varón de 62 años con osteopenia con adelgazamiento de las trabéculas y aumento del tamaño de los espacios medulares. El espesor trabecular promedio fue de 185.5 micras.

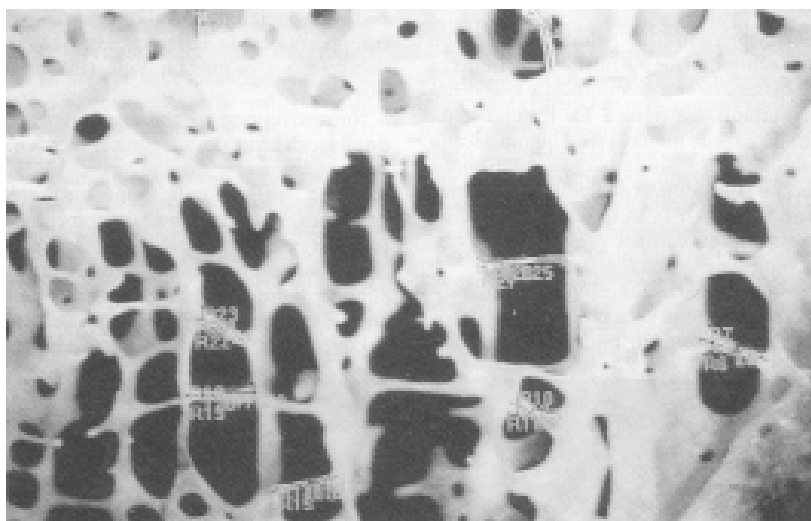


Fig. 7a. Corte frontal de una vértebra L3 con osteoporosis en una mujer de 48 años en donde se puede ver el adelgazamiento extremo de las trabéculas horizontales y verticales con aumento de los espacios medulares. El espesor trabecular promedio fue de 143.5 micras

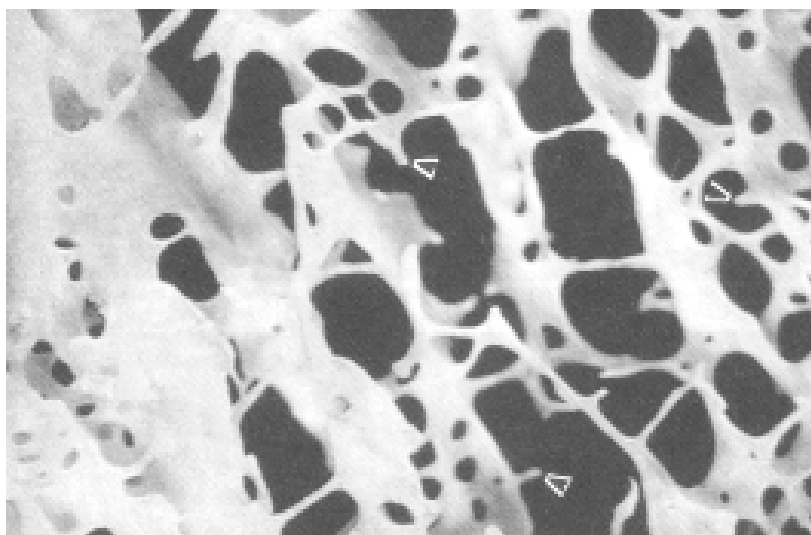


Fig. 7b. Corte frontal de una vértebra L3 con osteoporosis en una zona cercana al periostio del mismo caso anterior. Nótese la pérdida trabecular y el incremento de espacios medulares y la discontinuidad de las trabéculas terminando en forma libre (■).

En la literatura existen dos trabajos efectuados en vértebras lumbares, lo cual nos permitirá hacer algunas comparaciones. Moskilde²⁷ midió las trabéculas de la tercera lumbar, encontrando que las trabéculas horizontales se adelgazan paulatinamente de acuerdo con la edad, sin mencionar sus características en relación a grupos de edad. Grote²⁸ informó una pérdida del volumen óseo de la región lumbar hasta 53% en individuos entre 30 y 80 años mientras que la región torácica disminuía 41% y en la región cervical era de 24%.

En nuestro estudio encontramos que el espesor trabecular promedio medido en micrómetros disminuyó 45% en el grupo de mujeres que presentaban osteoporosis con edades comprendidas entre los 45 y 72 años y que en el varón la pérdida de espesor fue de un 25% entre los 47 y 62 años. La importancia de estos cambios en la microarquitectura trabecular horizontal, hace que el sostén de las trabéculas verticales pierda resistencia, además de que cuando las trabéculas se pierden, los espacios medulares se hacen mayores y la pérdida de estas trabéculas no se vuelven a

Tabla 3.

Correlación del espesor trabecular promedio y densidad mineral ósea en mujeres.

Edad	Espesor trabecular promedio (μm)	DMO (g/cm^2)
31	222.1	1.114 /N
45	126.3	0.733 /OP
48	143.5	0.618 /OP
66	154.2	0.258 /OP
72	158.2	0.825 /OP

DMO = Densidad Mineral Ósea

N = Normal

OPN = Osteopenia

OP = Osteoporosis.

recuperar. En condiciones normales todas las trabéculas son hechas por el proceso de osificación endocondral, de esta manera trabéculas nuevas no pueden aparecer después de una fusión a excepción de ciertas patologías como la enfermedad de Paget que da lugar la formación de tejido óseo dentro de la cavidad medular.

El mayor problema para efectuar un análisis de las trabéculas horizontales y verticales es el poder obtener un corte delgado del cuerpo vertebral. En nuestro trabajo se hizo un corte de la L3 incluyendo periostio, hueso cortical y trabecular con un espesor no mayor de 3 mm. Al efectuar el análisis de las trabéculas se pudo determinar que existían dos zonas en donde las trabéculas se adelgazaban o se perdían por desgaste, estas zonas se localizaron en la parte central o bien cerca del periostio como se muestra en la Fig. (5b). La pérdida de las trabéculas horizontales y persistencia de las verticales, es lo que hace que el radiólogo informe trabeculación aumentada y esto se explica porque la vértebra ha perdido densidad y el radiólogo sólo percibe líneas verticales.

En este estudio se encontró que entre mujeres de 30 y 40 años la densidad ósea estaba disminuida y se presentaron cambios con trabeculación aumentada. Consideramos que estos cambios están ocurriendo en una edad más temprana de acuerdo a lo publicado en la literatura.²⁹⁻³⁰ La explicación puede ser que estas mujeres por ser de estrato socioeconómico bajo, su ingesta de calcio en su niñez y pubertad haya sido muy baja o bien puede estar relacionada con aspectos étnicos o que se haya presentado una menopausia temprana.

En la literatura se ha mencionado que existen otros iones que intervienen en la masa ósea.³¹ Se ha demostrado una estrecha relación entre potasio, magnesio, vitamina c y fibra vegetal. La vitamina c interviene en la hidroxilación de la colágena y el magnesio juega un papel importante en la estabilización del fosfato de calcio amorfo. En nuestro trabajo encontramos que el magnesio fue determinado en siete casos por rayos x y microscopía electrónica de barrido y en nueve casos no se detectó. En teoría suponemos que las áreas estudiadas al azar en la que no había magnesio, se debió a que éste se encontraba por abajo del umbral para el cual está calibrado el equipo, esto no quiere decir que el ión esté ausente y para que sea detectado

Tabla 4.

Correlación del espesor trabecular promedio y densidad mineral ósea en hombres.

Edad	Espesor trabecular promedio (μm)	DMO (g/cm^2)
28	248.7	1.063 /N
46	249.7	1.249 /N
47	186.4	0.614 /OP
62	185.5	0.868 /OPN

DMO = Densidad Mineral Ósea

N = Normal

OPN = Osteopenia

OP = Osteoporosis

por el aparato se requiere una cantidad mínima determinada. Los elementos que se pueden detectar por análisis de rayos x con un microscopio de barrido debe ser por arriba de 0.3% y este será un análisis semicuantitativo y en un mapeo general el análisis será cualitativo.

Wachman y Bernstein³² proponen que en el adulto existe una homeostasis ácido básica en el esqueleto, y que la osteoporosis en parte pueda deberse a una movilización de las sales del esqueleto para balancear los ácidos endógenos.

Estudios de hueso invitro mencionan que la acidificación extracelular incrementa la actividad de los osteoclastos (células que intervienen en la resorción ósea) e inhiben la actividad de los osteoblastos (células que intervienen en la formación ósea).³³

La densidad ósea se ha considerado un parámetro bien validado, para conocer los límites entre osteopenia y osteoporosis, en nuestro estudio la relación g/cm^2 de hidroxiapatita estuvo dentro de los límites normales, en un caso en el grupo de mujeres y cuatro en hombres. Dentro de la osteopenia se encontraron a cinco varones y tres mujeres y con osteoporosis cuatro mujeres y cinco hombres. En este último grupo es importante señalar la presencia de osteopenia y osteoporosis en varones jóvenes. En la literatura se ha publicado que el grado de osteoporosis en hombres con edades entre 40 y 50 años es mínima, sin embargo en este trabajo se encontró que el varón puede presentar osteoporosis en edades más tempranas, si existen antecedentes de alcoholismo y tabaquismo.

En la literatura se ha informado que la asociación de alcohol, reduce notablemente los índices de formación de hueso, disminuyendo la densidad ósea. Spencer³⁴ en su trabajo informa que los varones que tienen antecedentes de alcoholismo desde su juventud, presentan osteoporosis antes de que se presente una cirrosis. Los trabajos de Bikle y col.³⁵ efectuados en ocho pacientes alcohólicos sin ninguna patología asociada como hipogonadismo, tratamiento con esteroides, hipercalcemia, encontró en siete de ellos que la densidad de las vértebras estaban por lo menos una desviación estándar por debajo de lo normal y en sus observaciones encontró una pérdida desproporcionada del hueso cortical.

Es bien conocido que la ingesta de alcohol inhibe el transporte de calcio así como la remodelación del hueso. Los trabajos de Rico³⁶ pudieron demostrar que los niveles de osteocalcina son suprimidos durante una intoxicación aguda de alcohol y que la osteocalcina se encuentra en niveles bajos en personas con alcoholismo crónico, actuando el alcohol en forma directa en la actividad osteoblástica.

Datos histomorfométricos sugieren que el alcohol suprime la formación de hueso e incrementa la resorción ósea. Existe la hipótesis de que tanto la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis pueden ser afectados en forma directa por el alcohol.³⁷ Los casos informados con osteopenia y osteoporosis en este estudio son personas en la segunda década de su vida y no podemos descartar que los cambios óseos pueden tener un origen idiopático.

En las observaciones efectuadas con microscopio electrónico de barrido para la localización puntual del calcio se encontró en una persona normal que la distribución de los iones de calcio era densa y homogénea, sin embargo cuando el análisis se efectuó en una persona con osteoporosis donde la densidad ósea estaba disminuida con cambios degenerativos y con evidencia de fractura, se observó que en el sitio de la probable fractura, se apreciaba una zona irregular que se parecía un callo óseo y en este mismo sitio la localización puntual de iones de calcio era densa comparada con las trabéculas y otras áreas en donde se apreciaba disminución de estos iones.

Esta tecnología puede ser muy valiosa y comparativa con el densitómetro, siempre y cuando se efectuará un análisis completo de todo el cuerpo vertebral, sin embargo, un estudio total requiere más de 90 horas de trabajo y es costoso. Es importante mencionar que existen otras metodologías para la determinación de elementos que constituyen la materia orgánica para determinar la cantidad total de calcio en un cuerpo vertebral como son: la técnica de espectroscopia de absorción atómica³⁸ o bien la técnica de digestión con horno de microondas.³⁹

La necesidad de conocer los riesgos de una osteopenia y osteoporosis en una población abierta del Distrito Federal nos permitió confirmar la importancia que tiene conocer aspectos éticos y nutricionales en personas de estrato socioeconómico bajo y poder compararlos con otros trabajos de países desarrollados. En la literatura existe una investigación realizada en una población americana mexicana,³⁸ informado el autor que la prevalencia de fracturas de columna vertebral era menor que en la raza blanca. Estos resultados llaman la atención, porque en nuestro trabajo la osteopenia y/o osteoporosis se presentó en personas más jóvenes de lo publicado en la literatura, probablemente este hallazgo puede estar relacionado con aspectos nutricionales, étnicos y grados de actividad física.

Referencias

- Riggs B. L. and Melton L. J. III *Involuntional Osteoporosis*. N Engl J Med 1986; 314: 1676-1686.
- Ross P. D. Osteoporosis. Frequency, consequences and risk factors. Arch Intern Med 1996; 156: 1399-1411.
- Meier D. E., Orwoll E. S. and Jones I. M. Marked disparity Between trabecular and cortical bone loss with age in healthy men. Ann Intern Med 1984; 101: 605-612.
- Melton L. J. III Osteoporosis 1996. *Global aspects of osteoporosis epidemiology*. Papapoulos S. E. et al., editors. Elsevier Science 1996: 79-86.
- Cooper C. and Barrett-Connor E. Osteoporosis 1996. *Epidemiology of osteoporosis*. Papapoulos S. E. et al., editors. Elsevier Science 1996: 75-77.
- Silman A. J. and O'Neill T. W. Osteoporosis 1996. *Epidemiology of vertebral fracture*. Papapoulos S. E. et al., editors. Elsevier Science 1996: 88-95.
- Gómez García F. y Figueroa G. F. *Epidemiología de fracturas en mayores de 50 años*. Rev Mex Ortop Traum 1988; 2(4): 114-117.
- Gómez García F. *Morbimortalidad de fracturas de cadera en el Hospital de Traumatología Magdalena de las Salinas*. IMSS. Rev Mex Ortop Traum 1988; 2(2): 48-52.
- Gómez García F., Clark P., De la Peña F., Orozco J. A. y Sales Carmona V. Factores de riesgo para el desarrollo de osteopenia y su relación con fracturas de cadera. Rev Mex Ortop Traum 1993; 7(5): 185-190.
- Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L. *Patología Estructural y funcional. El aparato locomotor*. 4a ed., Ed. Interamericana McGraw-Hill. 1990: 1391-1394.
- Riggs B. L., Wahner W. H., Dunn L. W., Mazess R. B., Offord K. P. and Melton L. J. III *Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging*. J Clin Invest 1981; 67: 328-335.
- Bonjour J. Ph., Theintz G., Law F., Slosman D. and Rizzoli R. *Peak bone mass*. Osteoporosis Int 1994; Suppl. 1: S7-13.
- Smith L. H., and Thier S. O. *Fisiopatología principios biológicos de la enfermedad*. Tejido conectivo. 2a ed. De Panamericana 1985; 594: 239-252.
- Mazess R. B. *On aging bone loss*. Clin Orthop 1982; 165: 239-252.
- Lindsay R., Hart D. M., Forrest C., Baird C. *Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomized women*. Lancet 1980; 2: 1151-1153.
- Kelepouris N., Harper K. D., Gannon F., Kaplan S., Haddad J. G. *Severe osteoporosis in men*. Ann Intern Med 1995; 123: 1151-1153.
- Cisneros D. F. y Méndez H. J. V. *Fracturas de los cuerpos vertebrales en ancianos osteopénicos. Tratamiento ortopédico conservador y uso de calcitonina y calcio como factores coadyuvantes*. Rev Mex Ortop Traum 1991; 5(2): 58-61.
- Grote H. J., Ameling M., Vogel M., Hahn M., Pösi M., and Dellling G. *Intervertebral variation in trabecular microarchitecture throughout the normal spine in relation to age*. Bone 1995; 16(3): 301-308.
- Ameling M., Hahn M., Weining V. J., and Grote H. J. *The microarchitecture of the axis as predisposing factor for fracture of the base of the odontoid process*. J Bone Joint Surg 1994; 76-A(12): 1840-1846.
- Parfitt A. M. *Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture*. Am J Med 1987; 82(1B): 68-72.
- Parfitt A. M., Mathews C. H. E., Villanueva A. R., Keerekopce M., Frame B., and Rao D. S. *Relationship between surface, volume and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis*. J Clin Invest 1983; 72: 1396-1406.
- Cooper C. and Barrett-Connor E. Osteoporosis 1996. *Epidemiology of osteoporosis*. Papapoulos S. E. et al., editors. Elsevier Science 1996.
- Cooper E., Atkinson WM, O'Fallon, Melton L. J. III *Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population based study in Rochester Minnesota*. 1985 - 1989 J B MR; 1992; 7: 221-117.
- Cisneros D. F. y Méndez H. J. V. *Fracturas de los cuerpos vertebrales en ancianos osteopénicos. Tratamiento ortopédico conservador y uso de calcitonina y calcio como factores coadyuvantes*. Rev Mex Ortop Traum 1991; 5(2): 58-62.
- Gómez García F. *Morbimortalidad de fracturas de cadera en el Hospital de Traumatología Magdalena de las Salinas*. IMSS. Rev Mex Ortop Traum 1988; 2(2): 48-52.
- Gómez García F., Clark P., De la Peña F., Orozco J. A. y Sales Carmona V. Factores de riesgo para el desarrollo de osteopenia y su relación con fracturas de cadera. Rev Mex Ortop Traum 1993; 7(5): 185-190.
- Mosekilde L. *Age-related changes in vertebral trabecular bone architecture Assessed by a new method*. Bone 1988; 9: 247-250.
- Grote H. J., Ameling M., Vogel M., Hahn M., Pösi M., and Dellling G. *Intervertebral variation in trabecular microarchitecture throughout the normal spine in relation to age*. Bone 1995; 16(3): 301-308.
- Atkinson P. J. *Variation in trabecular structure of vertebra with age*. Calcif tissue Res 1967; 1: 24-36.
- Keere Koper M., Frame B., and Rao, D. J. *Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis*. J. Clin Invest 1983; 72: 1396-1409.

31. Blumenthal, N.C., Betts, F., Posner A.S., *Stabilisation of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP*. Calcif Tissue Res 1977; 23: 245-250.
32. Wachman A., Bernstein, D.J.: *Diet and Osteoporosis* Lancet 1968; i: 958-959.
33. Kreiger N.S., Jessler, N.E., Bushinsky, D.A., *Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro*. Am J. Physiol 1992; 262: F 442- F 448.
34. Spencer, H., Rubio, N., Rubio, E., Indreika, M., Seitan, A.: *Chronic Alcoholism*. Am. J Med 1986; 80: 393-397.
35. Bikle D.D., Benant, H.J., Cann, Ch., Recker, R.R., Halton, B.P., Stewler, G. J.: *Bone Disease in alcohol abuse*. Ann Intern Med 1985; 103: 42-48.
36. Rico, H. et al. *Low Serum osteocalcin in acute alcohol intoxication. Direct toxic effect of alcohol on osteoblast*. Bone Min 1983; 2: 221-225.
37. Crilly R.G., et al.: *Bone histomorphometry bone mass and related parameters in alcohol males*. Calcif Tissue In 1988; 43: 269-276.
38. *Hand Book of atomic absorption analysis* Asha Varma, PH. D, F.A.I.C: CRC press, INC. vol. 1 y 2 pag. 501 y pag. 444. 1985.
39. *Técnica de digestión con horno de Microondas Manual de operación*. Perkin Elmer Multiwave. 1996.
40. Bauer, R.L., Richard, M.J., Deyo, A.: *Low risk of vertebral fracture in Mexican American Women*. Arch Intern Med 1987; 147: 1437-1439.

Apoptosis y degradación de matriz extracelular en corioamnios durante el trabajo de parto y en la ruptura prematura de membranas.

DR. FELIPE VADILLO ORTEGA, DR. FABIÁN ARECHEVALETA,
DR. JORGE BELTRÁN MONTOYA

RESUMEN

Antecedentes. Los mecanismos moleculares que conducen a la ruptura de las membranas corioamnióticas durante el trabajo de parto involucran a un grupo de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), que se sobreexpresan en la ruptura prematura de membranas (RPM). Uno de los miembros de esta familia de enzimas, la colagenasa tipo IV de 92 kDa se induce selectivamente durante ambos eventos. Desconocemos los mecanismos regulatorios de la expresión de estas enzimas en el corioamnios.

Objetivo. Determinar la presencia de fenómenos de muerte celular programada y expresión de MMP-9 en el corioamnios humano durante el trabajo de parto normal y en la ruptura prematura de membranas.

Material y Métodos: Se midió actividad gelatinolítica por zimografía en extractos de membranas con: (1) trabajo de parto, (2) cesárea y (3) RPM. Se analizó fragmentación del DNA *in situ* y en DNA extraído de las mismas membranas. Por medio de histoquímica se identificó MMP-9.

Resultados. Se observó aumento de actividad gelatinolítica en los extractos con RPM y trabajo de parto, comparativamente con los de cesárea. En todas las muestras se localizaron células apoptóticas, sin embargo, fueron escasas, abundantes o muy abundantes en las muestras de cesárea, trabajo de parto y RPM, respectivamente. La fragmentación *in situ* fue corroborada en las muestras de DNA extraído. La inmunohistoquímica mostró positividad para MMP-9 en las muestras provenientes de trabajo de parto y de RPM, no así en las de cesáreas. La inmunorreactividad de MMP-9 fue extensa en los casos de RPM y sólo se encontró en células que se encontraban en muerte celular programada.

Conclusión. Los resultados nos permiten asociar la presencia simultánea de muerte celular programada y la expresión/actividad de MMP-9 en el fenómeno de lisis o ruptura de las membranas fetales durante el trabajo de parto normal y su sobreexpresión en los casos de RPM. Estos dos fenómenos parecen ser secuenciales en el tiempo ya que sólo aquellas células que van hacia apoptosis inducen la expresión de la MMP-9.

(Vadillo, O.F. y col. *Apoptosis y degradación de matriz extracelular en corioamnios durante el trabajo del parto y en la ruptura prematura de membranas.* Ginec Obst Mex 66; 202)

SUMMARY

Background: The molecular mechanisms of chorioamniotic membranes rupture during labor are related with a group of enzymes named metalloproteinases of extracellular matrix (MMP), the production of these enzymes are elevated in premature rupture of membranes. The collagenase IV (molecular weight 92 kDa) is induced in specific form during both events. We unknown the regulatory mechanisms to these enzymes in the chorioamnios. **Objective:** To determine the presence of apoptosis and expression of (MMP-) in human chorioamnios during the labor and premature of the fetal membranes.

Material and methods: The gel lysis using zimography was determined in membranes of 1) Labor, 2) Cesarean section, 3) PRM. The analysis of DNA fragmentation *in situ* and DNA of the membranes was studied. Using immunohistochemistry techniques was identified MMP-9. **Results:** It was observed increase of gel lysis in stracts with PRM and labor in comparison with cesarean section. In all the specimens were found apoptotic cells, however, they were scarce, abundant or very abundant in cesarean section specimens, labor or PRM respectively. The fragmentation *in situ* was confirmed in specimens of DNA. The immunohistochemistry showed positively to MMP-9 in labor and PRM specimens, and not in cesarean section specimens. The MMP-9 immunoreactivity was extensive in PRM and only was found apoptosis.

Conclusions: The results demonstrate that apoptosis and expression-activity of MMP-9 can be associated to membranes rupture during labor and lysis, the same explanation may be true for the increased expression of MMP-9 in PRM both phenomena seems to have a sequence.

(Vadillo, D.F. et al: *Apoptosis and degradation extracellular matrix in chorioamnios during labor and premature membranes rupture* Ginec Obst Mex 66: 202)

Las membranas fetales o corioamnios son tejidos cuya función más general es mantener aislado al producto durante la gestación, sin embargo, desempeñan funciones poco comprendidas y que incluyen la síntesis del líquido amniótico, el inicio del trabajo de parto, mantenimiento de la tolerancia inmunológica al producto, secreción de hormonas, neuropéptidos, citocinas, etc¹. Las membranas fetales se mantienen íntegras y funcionales hasta las primeras fases del trabajo de parto normal pero, en hasta el 17% de todos los embarazos, pueden sufrir ruptura espontánea en ausencia de trabajo de parto y en forma previa al término de la gestación, condición patológica del embarazo que se denomina ruptura prematura de membranas (RPM)². Las explicaciones que se han dado para entender la causa de la RPM son aún insatisfactorias y se manifiestan de modo claro en la ausencia de medidas médicas preventivas y/o terapéuticas.

Diferentes estudios han señalado defectos mecánicos en las membranas fetales que se rompen de modo prematuro y dado que la fuerza tensil de estos tejidos reside en la alta proporción de tejido conectivo que contienen, la investigación de los mecanismos de esta enfermedad se ha orientado al estudio de defectos en la matriz extracelular que sostiene mecánicamente al corioamnios se debilita por acción de un grupo de enzimas denominadas metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), las cuales funcionan como mediadoras fisiológicas de la degradación del tejido conectivo³. La caracterización de este sistema enzimático en el corioamnios ha permitido identificar la expresión selectiva de la colagenasa tipo IV de 92 kDa (MMP-9) durante el trabajo de parto normal y su sobreexpresión en la RPM^{4,5}. En consonancia con estos hallazgos, otros grupos han informado la aparición de fenómenos de destrucción tisular en la membrana fetal durante el trabajo de parto. Así, en un modelo en ratas se ha mostrado estrecha relación entre la degradación de la

matriz extracelular coincidente con la activación de muerte celular programada (apoptosis) en el corioamnios durante el trabajo de parto⁶.

En este trabajo se pretende determinar la asociación temporal entre la expresión de la MMP-9 y la presencia de apoptosis en membranas corioamnióticas humanas durante el trabajo de parto y con RPM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tejidos.

Se colectaron membranas fetales de embarazos a término, con RPM y de embarazos a término con indicación de cesárea, sin trabajo de parto. Un fragmento de cada membrana fue fijado en solución de formalina (formol al 10% en solución amortiguadora de fosfatos) para realizar los estudios de inmunohistoquímica y la detección de fragmentación DNA *in situ*. Otros fragmentos se congelaron a -70°C en solución amortiguadora de fosfatos para la extracción de MMP y DNA. Se separaron manualmente el corion y el amnios para ser procesados individualmente.

Preparación de los extractos de corion y amnios.

Se homogeneizaron de 1 a 2 g de amnios y corion por separado en dos volúmenes de Tris 50 mM pH 7.4, que contenía NaCl 0.15 M y CaCl₂ 100 mM de acuerdo al método de Woessner y Taplin⁷. La concentración de proteínas de los homogeneizados se cuantificó de acuerdo al método de Bradford⁸.

Extracción de DNA de corion y amnios.

Se utilizó DNAzol (Gibco, BRL, Bethesda, U.S.A.) de acuerdo al método descrito por Cox⁹, el cual consiste en homogeneizar 30 mg de tejido en un ml de DNAzol, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10

minutos y centrifugación a 3,000 rpm para eliminar los fragmentos grandes. El DNA se precipitó con la adición de 0.5 ml de etanol al 100% por cada ml de DNAzol y centrifugación a 13,000 g durante cinco minutos. Se realizaron tres lavados con etanol al 70% y finalmente se resuspendió en Tris 10 mM pH 7.5 con EDTA 1.0 mM.

Zimografía.

Se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida -SDS al 18% de acuerdo a la técnica de Laemmli¹⁰, con excepción de que se agregó 1.0 mg/ml de gelatina durante la polimerización. Se utilizó un sistema con formato de mini-gel (Bio-Rad, Richmond, CA).

Se aplicaron 10 µg de las muestras a cada carril en condiciones no desnaturizantes y se corrieron a 10 mA constantes durante cuatro horas. Los geles se lavaron con Tritón X-100 durante 30 minutos para eliminar el SDS y se incubaron durante 24 horas a 37°C en solución de Tris 50 mM pH 7.4 con NaCl 0.15 M, CaCl₂ 20 mM y azida de sodio 0.02%. Al finalizar la incubación los geles se tiñeron con azul de coomassie R-250. En cada corrida se incluyó un carril que contenía marcadores de pesos moleculares preteñidos y MMP-9 purificada con estándar (Gibco BRL, Bethesda, U.S.A.). Las bandas de actividad fueron cuantificadas por densitometría en un equipo EagleEye (Stratagene, CA) y expresadas como actividad relativa.

Análisis electroforético del DNA genómico.

Las muestras de DNA obtenido se analizaron en un gel de agarosa al 1.8% según el método de Rósl¹¹, el cual consistió en incubar durante 60 minutos 1 µg de DNA con 5 U de la polimerasa Klenow y 0.5 µCi de ³²P-dCTP en solución de Tris 10mM pH 7.5 y MgCl₂ 5 mM. Al final de la incubación se agregó EDTA 10 mM y los nucleótidos no incorporados fueron removidos mediante tres precipitaciones con acetato de amonio 2.5 M e isopropanol. Finalmente el DNA marcado se resuspendió en Tris-EDTA pH 7.5. Se corrieron 250 ng del DNA marcado en electroforesis en gel de agarosa al 1.8% durante dos horas a 75 V constantes. Después de secar el gel en papeles Whatman 3 MM, se realizó autoradiografía.

Detección inmunohistoquímica del DNA fragmentado *in situ* y la gelatinasa de 92 kDa.

La detección del DNA fragmentado *in situ* se realizó de acuerdo al método descrito por Sgong¹², en donde se desparafinaron cortes de membranas según el procedimiento estándar. A estas preparaciones se les adicionó dUTP-fluoresceinado en presencia de la deoxinucleotidil transferasa terminal por 30 minutos a 37°C. La detección del dUTP se realizó mediante la adición de un anticuerpo conjugado, anti fluoresceína-peroxidasa, revelándose con una solución de diamino benzidina. Una vez terminada esta fase se continuó con la detección inmunohistoquímica de la

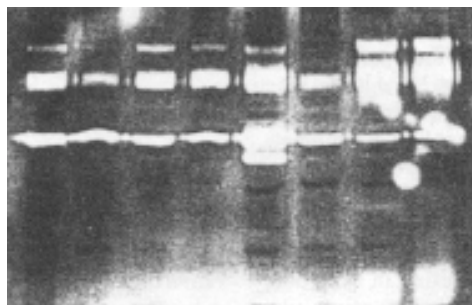


Figura 1.

Zimografía de los extractos de membranas amnióticas y coriónicas de los tres grupos y su trazo densitométrico. Los carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a extractos de membranas amnióticas del grupo de cesárea, trabajo de parto y RPM respectivamente. Los 2, 4, 6 y 8 corresponden a las membranas coriónicas del grupo de cesárea, trabajo de parto y RPM respectivamente. En esta figura se observa aumento de la actividad enzimática correspondiente a la MMP-9 en los carriles 5, 7 y 8, su trazo densitométrico muestra que en el caso del carril 5 la actividad aumentó 2 veces mientras que en los carriles 7 y 8 hasta tres veces en comparación con los carriles 1 al 4.

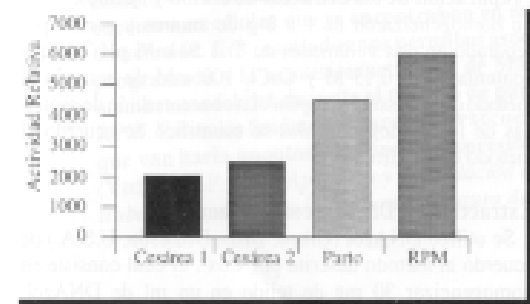


Fig. 1b

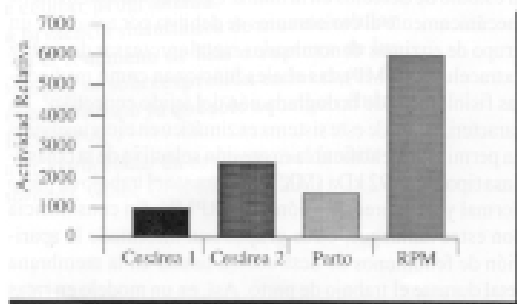


Fig. 1c



Figura 2a

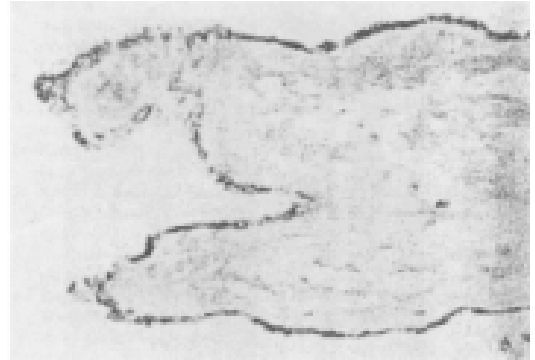


Figura 2b

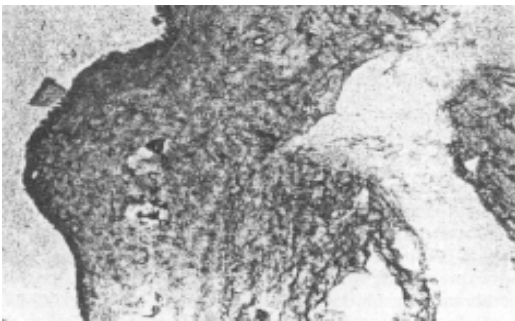


Figura 2c

Figura 2. Inmunohistoquímica de la localización de núcleos apoptóticos y MMP-9 en membranas fetales. (a) cesárea 40x. (b) trabajo de parto 10x, (c) RPM 10x y (d) RPM 40x. En esta figura se observa incremento de núcleos apoptóticos y de la enzima en las membranas con trabajo de parto y RPM en comparación con las membranas de cesárea. El número de células apoptóticas se correlaciona directamente con el incremento en la expresión de la MMP-9.

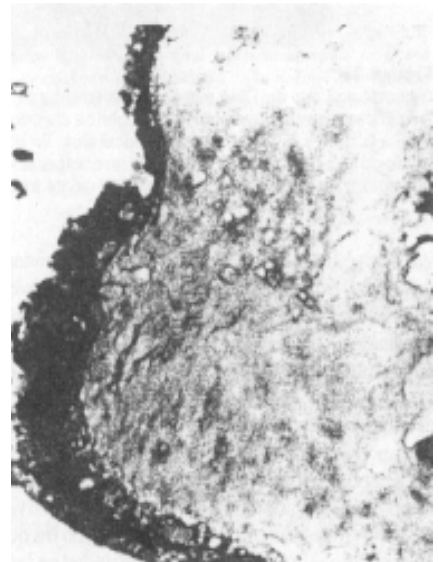


Figura 2d

MMP-9 en las mismas laminillas, utilizando el anticuerpo Ab-110 (gentilmente donado por el Dr. William Stetler-Stevenson, NIH), que reconoce la región inmediata al dominio de unión con los metales de la MMP-9. La tinción se realizó de acuerdo a la técnica del complejo avidina-biotina-fosfatasa alcalina (Vectastain AP-ABC kit, Vector, Burlingame, CA). Las laminillas se incubaron durante 20 minutos en presencia de suero de cabra a 37°C. El anticuerpo primario se adicionó a dilución de 1:1000 y se incubó por 45 min a 37°C. Esta incubación fue seguida por una segunda incubación de 30 minutos con el conjugado anticonejo-biotina y 30 minutos más con el complejo avidina-fosfatasa alcalina. El revelado se realizó utilizando como sustrato fosfato de bromocloroindol y azul de nitroretrozolol.

Resultados

Al explorar la expresión de la MMP-9 en las membranas fetales por zimografía, se confirmaron los hallazgos pre-

vios^{4,5}, en donde se observó incremento de la actividad enzimática tanto en el trabajo de parto como en la RPM. En algunas muestras la actividad gelatinolítica fue mayor en el amnios que en corion (Figura 1). La actividad de la banda correspondiente a la MMP-9 se incrementó hasta tres veces en los casos con RPM por arriba de los extractos preparados de membranas obtenidas por cesárea y hasta dos veces por arriba de los extractos obtenidos de muestras con trabajo de parto. Un gel representativo de estos ensayos y su trazo densitométrico correspondiente se presentan en la figura 1. La identificación de apoptosis *in situ* con la técnica TUNEL reveló que el amnios es la zona donde predominan células positivas para este indicador de muerte celular programada. La distribución de células positivas para apoptosis fue muy diferente entre los distintos tejidos. Las membranas provenientes de cesáreas programadas mostraron escasas células positivas esparcidas a lo largo del amnios (Figura 2a). Las membranas provenientes de trabajo de parto mostraron zonas al estilo de "parches" que fueron intensamente posi-

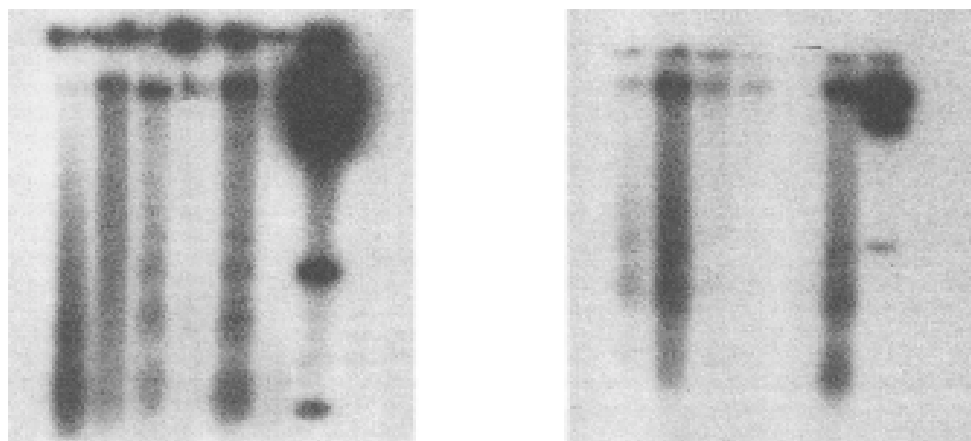


Figura 3.

Geles de agarosa del DNA extraído de membranas con trabajo de parto, cesárea y RPM. El pánél (a) corresponde al DNA de membranas amnióticas mientras que el (b) corresponde al corion. Los carriles 1 y 2 corresponden al grupo de trabajo de parto, 3 y 4 al de cesárea, 5 y 6 a la RPM y el 7 a los pesos moleculares. En esta figura se observa aumento de la fragmentación del DNA extraído de amnios del grupo de trabajo de parto y de la RPM en comparación con el DNA del grupo de cesárea. En cuanto al DNA extraído de corion se observa que sólo en el trabajo de parto y la RPM existe fragmentación.

vas, que se alternaban con zonas en las que algunas células eran positivas y otras no (Figura 2b). El amnios proveniente de los casos con RPM mostró la reactividad más intensa de los analizados e incluyó casi la totalidad del amnios y porciones extensas del corion (Figura 2c). La fragmentación de DNA en las muestras referidas arriba fueron confirmadas por electroforesis en geles de agarosa (Figura 3). La inmunodetección de la MMP-9 reveló patrones semejantes a los de apoptosis con nula reactividad intermedia en las muestras provenientes de cesáreas (Figura 2a), reactividad intermedia en las muestras con trabajo de parto, en las que se localizó en el estroma (Figura 2b) y alta reactividad en las muestras de casos con RPM, en las que se localizó tanto en el estroma como en el interior de las células (Figura 2d). La inmunoreactividad tuvo correlación directa con los datos de zimografía.

Comentario

El trabajo de parto humano resulta de la actividad simultánea de diferentes tejidos como el miometrio, el cérvix y las membranas fetales, que funcionan acoplados y/o en secuencia durante el parto normal. Una de las fases del parto consiste en la preparación de las membranas para su eventual ruptura durante la salida del producto de la cavidad uterina. Los cambios bioquímicos que operan durante este período están dirigidos a debilitar la fuerza mecánica del corioamnios, estos mecanismos moleculares han sido descritos recientemente^{4,5} y desconocemos la totalidad de los procesos regulatorios de su expresión. En este trabajo se presenta dos fenómenos que potencialmente contribuyen a la lisis de las membranas fetales en el parto normal y en la RPM. Por un lado se demuestra la inducción de muerte celular programada y la secreción/actividad de MMP-9 en coincidencia con el evento de ruptura de membranas normal y anormal. Aunque en la RPM ambos fenómenos parecen estar sobreexpresados en comparación con el trabajo de parto normal, la ausencia virtual de apoptosis e

inmunoreactividad de MMP-9 en los tejidos de casos de cesárea, en donde por definición las membranas se encuentran íntegras confirma la asociación de muerte celular programada y coexpresión de MMP-9 sólo en los casos en los que las membranas se están degradando. La identificación simultánea de células en apoptosis e inmunoreactividad a MMP-9 en el mismo tejido impone la necesidad definir cuál es el evento inicial. Es sabido que la degradación de la matriz extracelular induce apoptosis en algunas estirpes celulares¹³, lo cual podría establecer que la secreción de MMP-9 precede a la inducción provenientes de los hallazgos en las membranas con cesárea y algunas zonas de las membranas provenientes de casos con trabajo de parto en las que fue posible demostrar muerte celular programada en ausencia de reactividad a MMP-9, nos permite suponer que la activación de apoptosis precede a la inducción de enzimas que degradan matriz extracelular. En este sentido podríamos incluir a las MMP dentro de la oleada de enzimas proteolíticas inducidas durante la apoptosis, aunque habría que resaltar que la MMP-9 sería la primera de esa lista que tiene efectos líticos extracelulares. Así, la señal de inicio de degradación del corioamnios durante el trabajo de parto o en la RPM, debería ser un factor o factores que inducen apoptosis, que entre otras manifestaciones incluye la secreción de metaloproteasas de matriz extracelular, que degradarían el tejido conectivo de las membranas. En conjunto, ambos procesos deberían dar por resultado final disminución en la fuerza tensil de las membranas fetales, que ante la actividad mecánica de las contracciones uterinas terminaría en ruptura de normal o prematura.

La secuencia de eventos y los mediadores que controlan los procesos descritos permanecen desconocidos, sin embargo, el aumento de ciertas citocinas como el TNF- α durante la fase final del embarazo o la RPM^{14,16} lo hace un candidato importante para iniciar alguno o ambos de los procesos.

Referencias

- Petraglia F, Florio P, Napp C, Genazzani AR (1996). *Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine and endocrine mechanisms*. *Endocr Rev* 17:156-86.
- Normas de Procedimientos en Ginecología y Obstetricia*, Instituto Nacional de Perinatología México, 1990.
- Salamonsen LA (1996). *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endocrinology*. *TEM* 7:28-34.
- Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth E, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson W and Strauss JF. (1995) 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J pathol* 146:148-156.
- Vadillo-Ortega F, Hernandez A, González-Avila G, Bermejo L, Iwata K and Strauss JF (1996) Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 174:1371-1376.
- Lei H, Furth E, Kalluri R, Chiou T, Tilly K, Elkon K, Jeffrey J and Strauss JF (1996) A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest*, 98:1971-1978.
- Woessner JF, Taplin C. (1988) Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *J Biol Chem*, 263:16918-16925.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal biochem*, 72:248-254.
- Cox RA (1968) *Methods in Enzymology* (Grossmann L. And Moldave E., Eds.), 12 (B):120-129, Academic Press.
- Laemmli NK (1970) Clavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227:680-684.
- Rösl F. (1992) A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucl Acid Res* 20:5243.
- Sgong R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H and Wick G. (1994) Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet*, 10 (2):41-2.
- Meredith JE, Fazeli B and Schwartz MA. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 4:953-961.
- Romero R., Mazor M., Sepulveda W., Avila C., Copeland D. and Williams, J. (1992) Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol* 166:1576-1587.
- Opsjon S., wathen N., Tingulstad S., Wiedswang G., Sundan A., Waage A. and Austgulen R. (1993) Tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 169:397-404.
- Halgunet J., Johnsen H., Kjollesdal A. M., Qvisstad E., Espevik T. and Austgulen R. (1994) Cytokine levels in amniotic fluid and inflammatory changes in the placenta from normal deliveries at term. *Eur. J. Obstet. Gynecol.* 56:153-160.

“Un nuevo parámetro para evaluar la luteinización prematura: la relación molecular preovulatoria entre las concentraciones séricas de progesterona y estradiol”

DR. ALBERTO KABLY AMBE, DR. GERARDO MÉNDEZ ESPINOSA,
DR. JESÚS BARRÓN VALLEJO.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la relación molecular entre los niveles séricos preovulatorios de progesterona (P) y estradiol (E_2) y determinar el efecto que tienen en los resultados obtenidos con fertilización *in vitro*. Se estudiaron 62 parejas tratadas con el procedimiento, fue establecida la tasa molecular entre P y E_2 inmediatamente antes de administrar la gonadotropina coriónica humana (hCG). La concentración de P el día de la aplicación de hCG fue de 1.45 ± 0.06 ng/mL, el valor de la relación P: E_2 fue 0.63 ± 0.30 . Se observaron embarazos a partir de tasas moleculares de 0.22, no hubo gestaciones con tasa > 1.02 . No presentaron luteinización prematura en relación con las que no la tuvieron. En cuanto a la tasa de implantación aunque fue menor en pacientes con luteinización prematura, no hubo diferencia significativa con pacientes que no la presentaron. Se concluye que la relación mediante fertilización *in vitro*. En este trabajo como en otros reportes, la luteinización prematura no tuvo efecto sobre los resultados reproductivos.

(Kably, A.A. y col. *Un nuevo parámetro para evaluar la luteinización prematura: la relación molecular preovulatoria entre las concentraciones séricas de progesterona y estradiol*. Ginec Obst Mex 1998; 66: 208)

Palabras clave: Esterilidad, luteinización prematura, hiperestimulación ovárica controlada, fertilización *in vitro*.

SUMMARY

The objective was to evaluate the molecular ratio between the serum levels of progesterone (P) and estradiol (E_2) and to determine its effect on the *in vitro* fertilization performance. Sixty two couples were studied, the molecular P: E_2 ratio was established the day of human chorionic gonadotropin (hCG) injection. The mean serum P concentration the day of hCG administration 1.45 ± 0.06 ng/mL, while the mean P: E_2 ratio was 0.63 ± 0.30 . Pregnancies were observed since molecular ration of 0.22, no pregnancies were obtained if the molecular ratio was > 1.02 . No significant difference was detected in the fertilization and pregnancy rates in the patients who have or not premature luteinization. The implantation rate was low in patients with premature luteinization, however, there was not significant difference with patients without premature luteinization. In conclusion, the P: E_2 ratio surrounding 1.0 is desirable to obtain

adequate results in in vitro fertilization programs. In this work as others, the premature luteinization do not have effect in the reproductive results.

(Kably, A.A. y col. *A new parameter to evaluate the premature luteinization: the preovulatory molecular ratio between serum progesterone and estradiol*. Gineco Obst Mex 1998; 66: 208)

Key words: Infertility, premature luteinization, controlled ovarian hyperstimulation, in vitro fertilization.

Teóricamente la luteinización prematura produce alteraciones en la calidad de los óvulos y los embriones así como en la receptividad endometrial que pueden tener efecto nocivo sobre el pronóstico reproductivo de los pacientes. En la actualidad existe controversia sobre las posibles consecuencias que tiene la elevación prematura de los niveles de hormona luteinizante en los resultados de los programas de Reproducción Asistida^{1,2}.

Ante la aparente necesidad inhibir la luteinización prematura, la tasa de cancelación e incremento al éxito de la fertilización in vitro se ha hecho común el uso de agonistas de GnRH. No obstante, a pesar de la supresión hipofisaria consecuente siempre se observa una pequeña producción de progesterona en los días que preceden a la administración de la gonadotropina coriónica humana (hCG). Algunos autores han descrito un nivel crítico de progesterona > 0.9 ng/mL (Factor de conversión a SI 3.18) para definir a pacientes que tiene luteinización prematura y este valor empieza a considerarse típico de esta situación^{3,4}.

Aunque el mecanismo mediante el que la elevación prematura de progesterona puede tener efecto adverso sobre la fertilización in vitro no se ha establecido, se supone que la liberación precoz de la hormona por sí misma puede reducir la duración de la ventana de implantación. Los ciclos en donde se observa luteinización prematura son compatibles con la génesis de embriones de buena calidad. Cuando estos embriones se congelan y transfieren en ciclos ulteriores, los resultados reproductivos son similares a los vistos con la transferencia de embriones obtenidos en ciclos en los que no hubo liberación prematura de LH. Esto apoya también el concepto de un probable efecto deletéreo endometrial de la luteinización prematura⁵.

Por otra parte, se ha mencionado que los niveles suprafisiológicos de estradiol observados durante la hiperestimulación ovárica pueden también alterar la receptividad endometrial. Este fenómeno se observa principalmente en pacientes que tienen una respuesta ovárica intensa a la inducción de la ovulación⁶.

Es probable que por lo menos a nivel sérico se requiera que las concentraciones de estradiol y progesterona guarden una relación equilibrada, de tal manera que la enorme elevación de estradiol antes de la aplicación de la hCG no afecte la calidad del endometrio.

Hasta el momento actual no se han realizado trabajos que establezcan la relación "ideal" entre las dos hormonas mencionadas en el día en que se induce la maduración final de los óvulos en los programas de fertilización in vitro.

Este estudio clínico se diseñó para establecer un límite de corte de la relación progesterona: estradiol (P: E₂) en el

que se observan resultados reproductivos adecuados, esto no tomando en cuenta la definición "clásica" de luteinización prematura. Es necesario aclarar que se establecerá una relación sérica molécula-molécula y no la comparación habitual entre concentraciones absolutas de las hormonas medidas en unidades de sistema métrico decimal.

MATERIAL Y MÉTODOS

El reporte comprende los ciclos de tratamiento efectuados entre el 1 de julio de 1995 al 31 de diciembre de 1996. Se incluyen parejas tratadas con fertilización in vitro convencional (n=62). Las fechas para la realización de ciclos de fertilización in vitro se establecieron cada seis a ocho semanas. A las pacientes cuya menstruación no coincidía con los días programados se les administró acetato de noretisterona 10 mg/día a partir de la fase lútea media del ciclo previo. El medicamento se suspendió los días después de iniciar la supresión hipofisaria.

Las pacientes que fueron tratadas mediante supresión hipofisaria con acetato de leuprolide. El medicamento se inició en la fase lútea media del ciclo previo a la estimulación ovárica a dosis de 1.0 mg/día por vía subcutánea. El objetivo fue producir supresión de la función ovárica (Estradiol sérico <20 pg/mL. Factor de conversión a SI 3.671). Una vez iniciada la estimulación con gonadotropinas de dosis fue disminuida a 0.5 mg/día. El análogo de GnRH se administró hasta el día de la aplicación de la gonadotropina coriónica humana (hCG).

Para evaluar el desarrollo folicular se realizó ultrasonido transvaginal con transductor de 5.0 megaHertz (SSD-1100) el día dos del ciclo menstrual y se tomó una muestra de estradiol sérico. Si existió supresión ovárica se inició el protocolo de hiperestimulación que consistió en la aplicación de FSH pura (Urofollitropina) 300 UI/día durante tres días y menotropinas 300 UI/día hasta el día siete del ciclo. A partir del día ocho del ciclo se efectuaron exámenes ultrasonográficos diarios y el estradiol también se midió de manera cotidiana mediante inmunoanálisis (Laboratorio bioMérieux sa. Lyon, Francia). La variación intra e interensayo de las determinaciones de estradiol fue < 7.5% y < 9.5%, respectivamente. La dosis de menotropinas se ajustó entonces de acuerdo a los resultados del examen ultrasonográfico y los niveles de estradiol sérico. Las menotropinas se omitieron el día de la aplicación de la hCG.

La meta del protocolo de hiperestimulación ovárica controlada fue obtener un crecimiento folicular de 1-2 mm/día. Una vez que se observaron tres folículos dominantes con diámetro ≥ 16 mm; se administraron 10000 UI de hCG.

El día de la aplicación de la hCG se midieron mediante inmunoensayo los niveles de progesterona sérica (Laboratorio Ciba-Corning, México, D.F.); variación intra e interensayo 11.9% y 13.3%, respectivamente.

La hCG fue omitida y el ciclo cancelado si la paciente tuvo riesgo de desarrollar síndrome de hiperestimulación ovárica (valores de estradiol fueron mayores de 3500 pg/mL. Factor de conversión a SI 3.671).

La captura ovular fue realizada bajo sedación. Se efectuó por vía vaginal mediante guía ultrasonográfica 36 horas después de aplicar la hCG. La transferencia de los preembriones fue realizada a las 48 horas de haber practicado la captura de los óvulos.

A las pacientes que lograron el embarazo se les realizó suplemento de fase lútea con progesterona 100 mg/12 horas por vía intramuscular. En caso de embarazo, el medicamento fue suspendido al completarse las 12 semanas.

Para los fines del trabajo, se tomó en cuenta únicamente la existencia de embarazos clínicos. Estos fueron definidos como aquellos en los cuales la fracción beta de hCG en suero fue positiva (>25 mUI/mL. Factor de conversión a SI 1.0) (1^{er} Estandar Internacional de referencia, 75/537. Laboratorio Ciba-Corning, México, D.F.), cuya variación intra e interensayo fue $<5.0\%$ y $<8.5\%$ respectivamente. Además, de la detección de actividad cardíaca fetal por medio de ultrasonografía transvaginal.

Para establecer la relación molecular entre progesterona y estradiol se usó la siguiente fórmula [Concentración sérica de progesterona (ng/mL) $\times 3180$ (SI $\times 10^3$) - concentración sérica de estradiol (pg/mL) $\times 3.671$]. La comparación es estrictamente cuantitativa y toma en cuenta una relación molécula-molécula a nivel sérico.

Para el análisis estadístico, fue creada una base de datos en un programa comercial para computadora D-Base para

Windows®. La evaluación de los datos se efectuó mediante pruebas de estadística descriptiva, X^2 y comparación de varianzas. El valor de $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo en todas las pruebas. Los valores expresados representan promedio $\pm$ desviación standard a menos que se haga alguna acotación especial al respecto.

RESULTADOS

Los datos demográficos de las parejas incluidas en el estudio pueden observarse en la tabla 1.

Al evaluar el tipo de esterilidad se observó esterilidad primaria y secundaria en 54.5% y 45.6% de los casos, respectivamente.

La lesión tuboperitoneal continúa siendo la indicación más común para realizar fertilización invitro (figura 1). Dentro de las indicaciones complementarias (algunas parejas tenían dos más causas de esterilidad) se menciona la existencia de factor masculino; en estas circunstancias los autores se refieren en prácticamente todos los casos a pacientes con ausencia completa de células germinales. En ellas la fertilización se realizó con semen de donador previamente criopreservado.

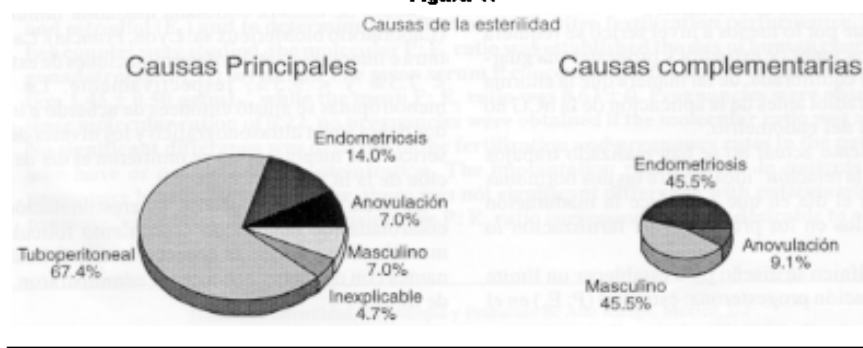
Los exámenes hormonales basales previos al procedimiento se ilustran en la tabla 2. Por otra parte, los valores de estradiol sérico durante el protocolo de estimulación son presentados en la figura 2 (en este caso específico los datos son mostrados como promedio $\pm$ error standard).

Las concentraciones de progesterona de todas las pacientes estudiadas el día de la administración de la hCG fueron de 1.45 ± 0.60 ng/mL (Factor de conversión a SI 3.18). El valor promedio de la relación molecular sérica progesterona: estradiol antes de inducir la maduración final de los óvulos fue de 0.63 ± 0.30 (valores referidos como moléculas de progesterona por cada molécula de estradiol). Se

Tabla 1.
Datos demográficos de las parejas.

Edad de la Paciente (años)	Edad del cónyuge (años)	Duración de la esterilidad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	IMC (Kg/M ²)
33.3 $\pm$ 4.4	35.8 $\pm$ 5.7	5.2 $\pm$ 2.9	59.7 $\pm$ 9.0	1.66 $\pm$ 0.06	23.5 $\pm$ 3.1

Figura 1.



observaron embarazos con tasas moleculares a partir de 0.22 sin embargo, no hubo gestaciones cuando la relación molecular entre las dos hormonas fue >1.02 .

Se presentaron embarazos en pacientes que cumplieron definición clásica de luteinización prematura, inclusive hubo un número similar de gestaciones en mujeres con valores de progesterona preovulatoria <0.9 ng/mL (X^2 $P>0.05$). No hubo diferencia significativa en los valores de progesterona sérica en pacientes que presentaron luteinización prematura en relación con pacientes que no tuvieron el mismo hallazgo endocrino (niveles de progesterona de 1.32 ± 0.76 versus 0.75 ± 0.34 , respectivamente). No hubo diferencia significativa en la relación molecular entre las dos hormonas estudiadas al comparar las pacientes con embarazos intra y extrauterinos ($P>0.05$).

Los resultados básicos del laboratorio de gametos son mostrados en la tabla 3. No hubo diferencia significativa en las tasas de fertilización de las pacientes con o sin luteinización prematura (dato no mostrado).

La tasa global de implantación fue de 18.5%. Aunque la tasa de implantación de las pacientes que tuvieron luteinización prematura tendió a ser menor que las que no la presentaron, no hubo diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos valores (21.6 ± 2.36 versus 26.3

± 2.3 , respectivamente). La tasa de embarazos ectópicos fue de 14.2%, tasa de aborto 28.5%.

En la figura 3 se observa la distribución de los embarazos de acuerdo a la causa del problema reproductivo. La lesión de la anatomía pélvica fue la condición en la cual el procedimiento es más eficiente.

COMENTARIO

En este trabajo se informan los resultados de la evaluación del estado hormonal de las pacientes tratadas mediante fertilización *in vitro* inmediatamente antes de administrar la gonadotropina coriónica. Se utilizó una fórmula que convierte los valores expresados en unidades del sistema métrico decimal en número de moléculas presentes en un volumen específico de suero. Con la metodología anterior se efectuó una relación estrictamente cuantitativa entre el número de moléculas séricas de progesterona y estradiol antes de que se observe el efecto luteinizante de la hCG.

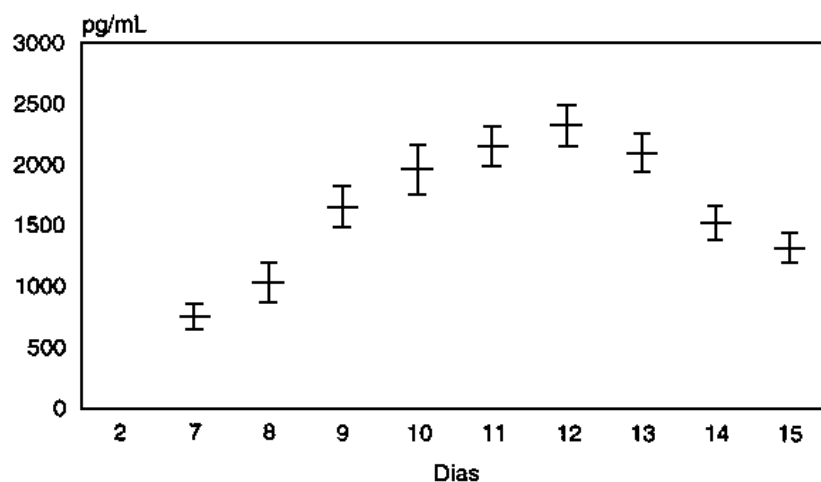
La hiperestimulación ovárica produce enormes cambios en el ambiente endocrino de las pacientes tratadas en métodos de Reproducción Asistida. En el caso del estradiol siempre se alcanzan concentraciones que son suprafisiológicas. Aunque resulta controversial, se afirma que las concentraciones elevadas de estradiol pueden afec-

Tabla 2.

Exámenes hormonales basales.

FSH (mUI/mL)	LH (mUI/mL)	Estradiol (pg/mL)
8.2 ± 3.7	7.6 ± 4.7	58.9 ± 38.0

Figura 2.
Valores de estradiol sérico



Valores expresados como promedio $\pm$ error standard

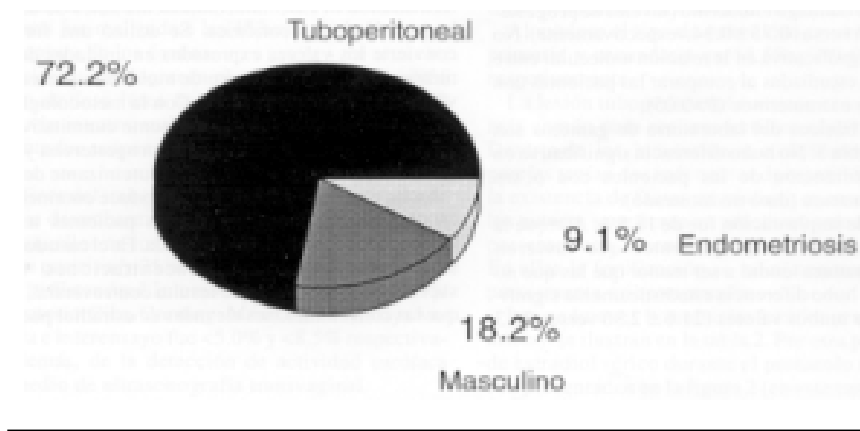
Tabla 3.

Resultados del Laboratorio de Gametos.

Óvulos obtenidos	Óvulos fertilizados	Tasa de fertilización	Preembriones transferidos
9.5 ± 7.5	5.6 ± 3.6	68.5 ± 26.7	4.1 ± 1.7

Figura 3.

Distribución de los embarazos de acuerdo a la causa de la esterilidad.



tar las tasas de fertilización e implantación en las pacientes tratadas con fertilización *in vitro*^{8,7}. En modelos animales se ha observado que la hiperestimulación ovárica puede reducir la tasa de implantación de los preembriones, mientras que en seres humanos los resultados son discordantes^{8,9}.

Los requerimientos preovulatorios de estradiol son relativamente bajos cuando se comparan con los observados cuando se utilizan dosis elevadas de inductores de la ovulación. Aún no se determina por qué los niveles elevados de estradiol pueden en algunas ocasiones tener efecto nocivo sobre el endometrio, pero se ha establecido que los valores superiores a 2500 pg/mL disminuyen de manera significativa la posibilidad de implantación. Se ha mencionado que este es un umbral endocrinológico por arriba del cual la ventana y la capacidad de implantación se reducen de manera significativa^{6,10}.

Es posible que los niveles elevados de estradiol alteren la fisiología e histología endometriales. Se ha visto que el uso de inductores de la ovulación incrementa la frecuencia de ciclos con endometrio asincrónico cuando se compara con ciclos no estimulados¹¹.

Lo más notorio de los reportes de la literatura que se refieren al efecto del hiperestrogenismo sobre la fertilización *in vitro* es la discordancia en los resultados. Algo similar sucede cuando se evalúa el efecto de las concentraciones preovulatorias de progesterona. Por ejemplo, este reporte al igual que otros negaría alguna acción perjudicial de la luteinización prematura sobre los resultados reproductivos.

La evaluación del efecto de la LH y progesterona en la fertilización *in vitro* al igual que en el caso del estradiol también ha sido eminentemente aislado. Hasta el momento no se han hecho estudios que determinen el efecto sincrónico de ambas hormonas sobre la Reproducción Asistida.

Más que las concentraciones totales de estradiol o progesterona es posible que la relación entre ambas establezca parcialmente la posibilidad de éxito o fracaso de la fertilización *in vitro*. Además de los supuestos efectos de la luteinización prematura sobre la calidad del óvulo y el preembrion hay que tomar en cuenta la acción de la progesterona a nivel del endometrio. Es bien sabido que la hormona retinge los efectos fisiológicos y suprafisiológicos del estradiol. En este sentido es también probable que se necesite una concentración sérica y principalmente endometrial de progesterona que limite el efecto nocivo de los niveles elevados de estradiol sobre la capacidad y la ventana de implantación.

En este trabajo se observó que la relación preovulatoria sérica entre progesterona y estradiol es alrededor de 1.0 en pacientes que logran el embarazo. Esto no quiere decir que sea la concentración ideal, sino la más aceptablemente observada en condiciones de hiperestimulación ovárica controlada. Es necesario recordar que en un ciclo natural el valor de la relación es aproximadamente de cinco moléculas de progesterona por cada molécula de estradiol sérico.

Las concentraciones séricas de las hormonas no determinan su acción biológica, sólo son una forma práctica de estudiarla, los autores sugieren realizar una evaluación

exhaustiva de las relaciones moleculares entre hormonas esteroideas en condiciones normales y en ciclos artificiales. No obstante, es probable que la cuantificación de receptores esteroideos a nivel de endometrio o los ensayos biológicos sean más útiles en este sentido.

Ya sea que se realicen determinaciones de relaciones moleculares a niveles sérico o de receptores celulares, es probable que se necesite determinar cuáles son las condiciones ideales en que las concentraciones suprafisiológicas de estradiol no tengan efecto nocivo sobre la receptividad endometrial. Otro aspecto importante para evaluar en el futuro es la hipótesis mencionada por los autores, en el sentido que la progesterona preovulatoria pueda tener efecto restrictivo sobre la acción del estradiol. Quizás sea necesario plantear nuevamente el concepto de luteinización prematura, y determinar exactamente cuál es el papel y acción de las elevaciones precoces de progesterona.

Como corolario se puede establecer que la relación sérica entre progesterona y estradiol parece en parte determinar la posibilidad de que una paciente logre el embarazo cuando se realiza fertilización in vitro. La medición aislada de los niveles absolutos de estradiol y progesterona ha demostrado ser poco confiable en una gran cantidad de estudios y debe de ser analizada profundamente.

Referencias

- Moffitt DV, Queenan JT, Shaw R, Muasher SJ. *Progesterone levels on the day of human chorionic gonadotropin do not predict pregnancy outcome from the transfer of fresh or cryopreserved embryos from the same cohort.* Fertil Steril 1997; 67: 296-300.
- Schoolcraft W, Sinton E, Schlenker T, Hyunh D, Hamilton F, Meldrum DR. *Lower pregnancy rate with premature luteinization during pituitary suppression with leuprolide acetate.* Fertil Steril 1991; 55: 563-566.
- Fanchin R, de Ziegler D, Taieb J, Hazout A, Frydman R. *Premature elevation of plasma progesterone alters pregnancy rates of in vitro fertilization and embryo transfer.* Fertil Steril 1993; 59: 1090-1094.
- Burns WN, Witz CA, Klein NA, Silverberg KM, Schenken RS. *Serum progesterone concentrations on the day of after human chorionic gonadotropin administration and progesterone/ovocyte ratios predict in vitro fertilization/embryo transfer outcome.* J Assist Reprod Genet 1994; 11: 17-23.
- Hofmann GE, Bergh PA, Guzman I, Masuku S, Navot D. *Premature luteinization is not eliminated by pituitary desensitization with leuprolide acetate in women undergoing gonadotrophin stimulation who demonstrated premature luteinization in a prior gonadotrophin-only cycle.* Hum Reprod 1993; 8: 695-698.
- Simón C, Cano F, Valbuena D, Remohí J, Pellicer A. *Clinical evidence for a detrimental effect on uterine receptivity of high serum estradiol concentrations in high and normal responder patients.* Hum Reprod 1995; 10: 2432-2437.
- Toner J, Brzyski R, Oehninger S, Vecch L, Simonetti S, Muasher S. *Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on in-vitro fertilization outcome.* Hum Reprod 1991; 6: 284-289.
- Fossum GT, Davidson A, Paulson RJ. *Ovarian hyperstimulation inhibits embryo implantation in the mouse.* J In Vitro Fertil Embryo Transfer 1989; 6: 7-10.
- Chenette PE, Sauer MV, Paulson RJ. *Very high serum estradiol levels are not detrimental to clinical outcome of in vitro fertilization.* Fertil Steril 1990; 54: 585-586.
- Forman R, Fries N, Testart J, Belaisch-Allan J, Hazout A, Frydman R. *Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation.* Fertil Steril 1988; 49: 118-122.
- Benediva CA, Metzger DA. *Superovulation with human menopausal gonadotropins is associated with endometrial gland-estroma dyssynchrony.* Fertil Steril 1994; 61: 700-704.

Donación de óvulos: experiencia de tres años en el Centro de Ginecología y Obstetricia de Monterrey.

DR. ROGELIO MONTEMAYOR GARZA, DR. CÉSAR A. CRUZ SALAS, DR. DARIO MONTOYA GARZA, DR. JOEL VALDEZ, DR. PEDRO GALACHE VEGA, DR. ROBERTO SANTOS HALAISCAK, DR. SAMUEL HERNÁNDEZ AYUP, DRA. MÓNICA RUY, T.L. GENARO GARCÍA VILLAFÁÑA, Q.B.F. GRISELDA MARTÍNEZ CAUDILLO.

Resumen

Objetivo: Valorar las tasas de embarazo, nacidos vivos, índice de implantación y tipo de donadora en nuestro programa de Reproducción Asistida con donación de óvulos.

Introducción. La donación de óvulos es un pilar en la reproducción asistida ya que nos aumenta las tasas de embarazos en pacientes con ausencia o disminución de la función ovárica dando las mismas oportunidades que las pacientes sin disfunción ovárica.

Material y métodos: Se incluyeron 98 procedimientos de donación en pacientes receptoras de los cuales fueron 87 FIV-TE y 11 GIFT entre marzo de 1994 y junio de 1997. Las subdividimos por grupos de edad grupo 1: menores de 30 años, grupo 2: de 30 a 34 años, grupo 3: de 35 a 39 años y grupo 4: de 40 años y más. Dividimos las donadoras en anónimas (72) y conocidas (26) y analizamos resultados.

Resultados: de los 87 FIV-TE-D se obtuvieron 48 embarazos (55.17%) con 31 nacidos vivos (35.63%). De los 11 procedimientos de GIFT-D hubo cinco embarazos y cinco recién nacidos vivos (45.45%). El índice de implantación fue de 17.5% para FIV-TE y 13.8 para GIFT. De las donadoras anónimas fueron 44 embarazos (61.11%) y de las conocidas 9 (34.61%).

Conclusiones: Nuestros resultados se encuentran dentro de los informados a nivel mundial observando una diferencia muy significativa entre las tasas de embarazo con óvulos de donadoras conocidas y anónimas por lo que se debe hacer especial énfasis en la selección adecuada de la donadora conocida.

(Montemayor, G.R. y col: *Donación de óvulos: experiencia de tres años en el Centro de Ginecología y Obstetricia de Monterrey*. Ginec Obst Mex 1998; 66:214)

Summary

Objective: Evaluating the rate of pregnancies, neonates, implantation rate and kinds of donor in our program Assisted Reproduction with oocyte donation.

Introduction: The oocyte donation is the most important support in assisted reproduction because in patients with ovarian failure, offering the same opportunity to female without ovarian alterations to increase the rate of pregnancies.

Material and methods: 98 donor's procedures were included in host patients; 87 were FIV-TE and 11 GIFT between march to june 1997. The patients were divided in age group: 1) <30 years, 2) 30 to 34 years, 3) 35 to 39 years, 4) ≥40 years. The donors were divided in known (26) and unknown (72). The results were analysed.

Results: 48 pregnancies (55.17%) of the 87 FIV-TE-D group were obtained with 31 neonates

The implantation rate was 17.5% to FIV-TE group and 13.8 to GIFT group. 44 (61.11%) pregnancies were from unknown donors group and 9 (34.61%) from known donors group.

Conclusions: Our results are similar to others international reports, we have observed a little and significant difference between pregnancy with oocytes from known donors and unknown donors; this is the principal motive to be selective in the suitable known donor.

(Montemayor, G.R. et al: *Oocyte donation: three years of experience in the Gynecology and Obstetric Center of Monterrey*. Ginec Obst Mex 1998 66: 214).

El descenso normal de la fertilidad humana en relación con la edad de la mujer está bien documentado tanto en el caso de las parejas fértiles como en el las infértiles. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en pacientes que se someten a tratamientos de infertilidad han demostrado que el embarazo acumulativo y los índices de nacidos vivos son muy estables hasta los 34-37 años. Después de esa edad se observa un descenso¹. Existe un debate en que si este descenso en la fertilidad femenina relacionado con la edad depende principalmente del proceso de envejecimiento del útero o del ovocito. La creciente incidencia de pérdidas tempranas en el embarazo y anormalidades cromosómicas del ovocito en mujeres mayores, se ofrece como una evidencia que apoya la reducción de la calidad biológica del ovocito con la edad. Además el cambio de sentido de las tasas de embarazo mas bajas, al igual que unas tasas de aborto mas altas, en pacientes de mas edad apoya fuertemente esta evidencia.

Existen otras posibilidades de disminución o pérdida de la capacidad reproductora como la disminución del volumen ovárico por quimioterapia o radioterapia, la extirpación quirúrgica parcial o total y la falla ovárica prematura^{2,3,4}.

La donación de ovocitos es una técnica de reproducción asistida, en la cual, el gameto femenino es aportado por una mujer distinta a la que recibirá éste o el embrión resultante.

La primera gestación obtenida mediante esta técnica fue en 1983 por Trounson y col y la primera gestación a término en 1984 por Lutjen y col en una mujer con falla ovárica. La relativa inaccesibilidad de los gametos femeninos y la dificultad de la sincronización entre el proceso ovulatorio de la donante y el desarrollo endometrial de la receptora produjeron un retraso de 99 años en conseguir gestación con gametos femeninos donados con respecto a los masculinos⁵.

En 1987 Yovich y col introducen con éxito la transferencia tubárica de cigotos en donación de ovocitos y en 1988 Asch y col la transferencia tubárica de gametos (GIFT). El mismo año fue también publicado el primer embarazo con cigotos criopreservados^{5,6,7}.

Actualmente la donación de ovocitos es una alternativa de tratamiento altamente eficiente debido al perfeccionamiento en las técnicas de reproducción asistida, para el manejo de la infertilidad en la mujer con factor ovárico. Independientemente del diagnóstico. Las receptoras de todas las edades experimentan rangos de nacimientos de 30-40 % por ciclo de transferencia; si a este porcentaje se le suma la tasa acumulativa el rango de embarazo y nacimiento excede el 90% durante el cuarto ciclo de transferencia^{1,4}, estas altas tasas de implantación y nacimiento vistas aún en pacientes perimenopáusicas han hecho que durante los últimos años se haya incrementado el número de centros de tratamiento de infertilidad que manejan donación de

ovocitos y así mismo, que las indicaciones se hallan expandido y se halla convertido en un método de tratamiento mas común y mas aceptado^{8,9,10}.

Es el objetivo de este estudio comparar los resultados del índice de implantación y nacidos vivos en nuestro programa de donación de óvulos en las diferentes edades, con los publicados a nivel mundial y así mismo, valorar otros factores, como el diagnóstico de la receptora y el tipo de donadora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron en este estudio todas las pacientes que ingresaron al programa de reproducción asistida con donación de óvulos entre Marzo de 1994 y Junio de 1997 en el Instituto Para el Estudio de la Concepción Humana del Centro de Ginecología y Obstetricia de Monterrey.

Metodología del reemplazo hormonal de estrógenos y de estimulación ovárica.

a) Protocolo de reemplazo hormonal en las receptoras: Se utilizó un agonista de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (a-GnRH) en pacientes con función ovárica, iniciando seis días antes del ciclo de reemplazo hormonal para la transferencia.

En las pacientes sin función ovárica se realizó un ciclo menstrual con hormonales combinados previo al protocolo de reemplazo hormonal y no se utilizó a-GnRH.

Para el reemplazo hormonal se utilizó valeraniato de estradiol 2 mg diarios por vía oral del día 2 al 4 del ciclo, 4 mg del día 5 al 7, 6 mg del día 8 al 10, continuando con 6 a 8 mg diarios de acuerdo a la respuesta obtenida en el endometrio. Esta respuesta fue valorada por ultrasonido transvaginal (Hitachi EUB-315 Transductor de 5.0 Mhz) y monitorización sérica de estradiol a partir del día 8 del ciclo. El objetivo fue lograr un endometrio mayor de 8 mm y trilaminar, con un estradiol sérico mayor de 300 pg/dl.

En las receptoras se utilizó un agonista de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (a-GnRH) en pacientes con función ovárica, iniciando seis días antes del ciclo de reemplazo hormonal para la transferencia.

En las pacientes sin función ovárica se realizó un ciclo menstrual con hormonales combinados previo al protocolo de reemplazo hormonal y no se utilizó a-GnRH.

b) Protocolo de estimulación.

Las donadoras se dividieron en dos grupos, las anónimas y las conocidas por las receptoras, analizando el porcentaje de embarazo en cada grupo. En la estimulación ovárica de las donadoras se utilizó el protocolo intermedio con a-GnRH y menotropinas hipofisarias iniciando el segundo día del ciclo de estimulación.

Se realizó monitorización del crecimiento y desarrollo folicular por ultrasonido vaginal, considerando madurez folicular un diámetro superior a 16 mm y un estradiol sérico de 250 a 300 pg/dl por folículo.

Se aplicó Gonadotropina Coriónica Humana 10,000 UI por vía intramuscular en dosis única el día 12 o 13 del ciclo (de acuerdo a la madurez folicular) y 36 horas después se realizó aspiración folicular por vía trasvaginal guiada por ultrasonido, con una aguja de aspiración de Asch (Echotip Asch Aspiration needle set 17 35 cm con tubo de succión de la casa Cook Og/Gyn USA).

Se inseminó con una concentración de espermatozoides de 50 a 200,000 espermatozoides por óvulo con precapacitación previa en triple gradiente de Percoll, se valoró fertilización a las 24 h y a las 48 h. En la valoración de los preembriones a las 48 horas de inseminados se realiza la selección de los que serán transferidos a la cavidad uterina y los que serán criopreservados.

La transferencia embrionaria se realiza con un catéter de Frydman (Frydman catheter for embryo transfer de la casa comercial Laboratorio cod, Paris Francia). En los procedimientos de GIFT, los óvulos se inseminaron con la misma concentración de espermatozoides, transfiriéndose a trompa de falopio con un catéter de Marrs (Marrs GIFT catheter 5 Fr 30 cms de la casa comercial Cook Ob/Gyn USA).

Se suplementó con progesterona intramuscular (100 mg IM de solución oleosa) iniciando el día de la aspiración de la donadora y continuando hasta el día 14 postransferencia en que se realizó fracción beta cuantitativa de HCG sérica continuando por 80 días si el resultado fue positivo.

La terapia de reemplazo estrogénico, continúa también por un lapso de 80 días si el resultado fue positivo.

Cuando la Fracción Beta sérica resultó positiva, el embarazo se monitorizó hasta corroborar el embarazo clínico (visualización del saco gestacional con actividad cardíaca fetal) y posteriormente el control prenatal se manejó en forma acostumbrada.

En este estudio se incluyeron 98 procedimientos de donación en pacientes receptoras del programa de reproducción asistida del Instituto Para el Estudio de la Concepción Humana del Centro de Ginecología y Obstetricia de Monterrey de Marzo de 1994 a Junio de 1997. De estas 98 pacientes fueron 87 de FIVTE y 11 de GIFT, subdividiéndolas por grupos de edad: Grupo I: < de 30 años, Grupo II: de 30-34 años. Grupo III: de 35 a 39 años. Grupo IV: de 40 años o mas.

De las donadoras, fueron 72 anónimas (73.4%) y 26 conocidas (26.5%), siendo generalmente hermanas de la receptora.

Se analizaron el porcentaje de embarazos, los recién nacidos vivos, índice de implantación y el tipo de donadora. El índice de implantación se obtuvo con base en el número de embriones transferidos en cada grupo de pacientes y a los sacos gestacionales observados por ultrasonido trasvaginal (No. sacos gestacionales X 100/ No. embriones transferidos). El análisis estadístico fue el de múltiplos de la media y porcentual.

Las donadoras en nuestro programa son generalmente menores de 30 años y siempre menores de 35, de preferencia con fertilidad probada, sanas, sin antecedentes de enfermedades genéticas y estables psicológica y emocionalmente.

La selección de las candidatas a donación de óvulos se llevó a cabo bajo los siguientes puntos y en esa secuencia.

A) Contacto inicial: Realizado por el médico encargado del programa de donación y es para proporcionar la información detallada sobre el procedimiento, lo que es la reproducción asistida, el protocolo de estimulación ovárica y la aspiración folicular y los riesgos potenciales de estos procedimientos.

B) Valoración médica: Se realiza el mismo día del contacto inicial e incluye un examen médico integral, desde una historia clínica completa, hasta un examen ginecológico y un ultrasonido trasvaginal, para la valoración de útero y anexos.

C) Valoración psicológica: Es aplicada por una Licenciada en Psicología con especialidad en el manejo de parejas con esterilidad en programas de reproducción asistida y se lleva a cabo mediante una entrevista personal donde se investiga el área reproductiva, el estado mental, la historia sexual, la relación de pareja, la relación familiar, el nivel cultural y la influencia religiosa de la donadora. Así mismo se realiza una evaluación de la personalidad a través del inventario multifacético de la personalidad (MMPI) y se evalúa el estado de ansiedad utilizando el inventario de ansiedad rango-estado (IDARE).

D) Valoración genética: Realizada por un genetista y enfocada principalmente a la exploración del árbol genealógico y a la valoración de malformaciones menores que pudieran orientar a la presencia de síndromes subclínicos.

E) Valoración de laboratorio: Los exámenes de laboratorio que se practican a la donadora, incluyen los de rutina como biometría hemática, química sanguínea, grupo y RH y general de orina, así como pruebas especiales guiadas principalmente al diagnóstico de enfermedades infecto-contagiosas, como pruebas de funcionamiento hepático, Anticuerpos antihepatitis, VIH, VDRL y otros.

Tabla No. 1.

Resultados globales de embarazo e índice de implantación en procedimientos de donación de óvulos.

Procedimiento	Casos	Embarazos	%	R.N. Vivos	%	Implantación
FIVTE-D	87	48	55.17	31	35.6	17.6
GIFT-D	11	5	45.45	5	45.45	13.6
TOTAL	98	53	54.08	36*	35.7	15.7

Tabla No. 2

Resultados de embarazos, recién nacidos e índice de implantación por grupo de edad en FIVTE-D.

Edad receptora	Casos	Embarazos	%	R.N. vivos	%	Índice de Implantación
<30	8	4	50.00	4	50.00	22.2
30-34	18	7	38.88	6	33.33	11.1
35-39	31	20	64.51	11	35.48	18.0
40 y >	30	17	56.55	11	36.66	20.6
TOTAL	87	48	55.17	31	35.63	17.9

Tabla No. 3.

Resultados de embarazo, recién nacidos e índice de implantación por grupos de edad en GIFT-D.

Edad Receptora	Casos	Embarazos	%	R.N. vivos	%	Índice de Implantación
<30	1	0	00.00	0	0	0
30-34	1	1	100	1	100	25
35-39	5	3	60	3	60	22
40 y >	4	1	25	1	25	8.3
Total	11	5	45.45	5	45.45	13.8

Tabla No. 4.

Comparación de porcentaje de resultados de embarazo por grupos de donadoras anónimas y conocidas.

Donadoras	Casos	%	Embarazos	%
Anónimas	72	73.46	44	61.11
Conocidas	26	26.54	9	34.61
Total	98	100	53	54.08

Después de estos puntos de valoración, la paciente donadora fue aceptada para ingresar a nuestro programa de reproducción asistida.

RESULTADOS

Entre Marzo de 1994 y junio de 1997 se realizaron un total de 98 procedimientos de donación de óvulos. De estos 98 procedimientos, 87 fueron de FIVTE y 11 de GIFT. De los 87 procedimientos de FIVTE-D se obtuvieron 48 embarazos (55.17%), con 31 nacidos vivos (35.6%) y dos embarazos que actualmente se encuentran a finales del primer trimestre. De los 11 procedimientos de GIFT-D hubo cinco embarazos (45.45%) y cinco recién nacidos vivos. El índice de implantación fue de 17.6% para FIVTE y 13.8% para GIFT. De los 98 casos, hubo 53 embarazos (54%) con 36 nacidos vivos (36.7%) y dos que se encuentran en gestación. (tabla 1).

Los resultados por grupo de edad son como sigue:

Fertilización in vitro: Grupo I (< de 30 años) fueron ocho casos resultado cuatro embarazos (50%) y cuatro recién nacidos vivos; el índice de implantación fue de 22.2%. En el grupo II (30-34 años) 18 casos con siete embarazos

(38.88) y seis recién nacidos vivos (33.33); el índice de implantación fue de 11.1%. En el grupo 3 (35-39 años) 31 casos con 20 embarazos (64.51) y 11 recién nacidos de término (35.48) y un embarazo gemelar cursando el final del primer trimestre; el índice de implantación fue de 18.0%. En el grupo IV (40 o más años) hubo 30 pacientes y 17 embarazos clínicos (56.55%) con 11 recién nacidos de término (36.66%) y uno en evolución; el índice de implantación en este grupo fue de 20.6%. En total de los 87 procedimientos de FIVTE-D hubo 48 embarazos (55.17%) con 31 recién nacidos vivos (35.63%) y dos embarazos en evolución de los cuales uno es gemelar; el índice de implantación fue de 17.9%. (tabla 2).

Transferencia intratubaria de gametos (GIFT): Grupo I: un caso sin lograrse embarazo. grupo II: un caso lográndose embarazo con un saco gestacional y un recién nacido vivo (100%); el índice de implantación fue de 25%. En el grupo III hubo cinco pacientes, lográndose tres embarazos clínicos (60%) con un índice de implantación de 22.0%. En el grupo IV fueron cuatro pacientes, lográndose un embarazo (25%), con un índice de implantación de 8.3%. El total de procedimientos de GIFT-D fueron 11, lográndose cinco embarazos con un índice de implantación de 13.8%. (Tabla 3).

De las 96 pacientes donadoras 72 fueron anónimas (73.46%) de las cuales se embarazaron 44 (61.11%). Las restantes 26 donadoras que fueron en su mayoría hermanas de las receptoras se embarazaron 9 (34.61%). (Tabla 4).

COMENTARIO

La donación de ovocitos es un modelo ideal para estudiar la implantación y el embarazo humano debido a que se separa por completo la calidad del embrión y la del útero receptor. A este respecto, diversos estudios sugieren que en las pacientes de 30 a 50 años, el útero humano no sufre cambios sustanciales en lo que respecta a implantación de embriones y mantenimiento de esta implantación^{12,13,14}. Asimismo, el grosor endometrial, los receptores de estradiol, progesterona y la histología endometrial, permanecen constantes desde la tercera a la sexta década de la vida^{15,16}. Sin embargo, otros autores han subrayado que el envejecimiento endometrial es el principal factor responsable de las tasas de embarazos decrecientes en humanos¹⁷ y se ha sugerido el aumento en la dosis de progesterona de 50 a 100 mg por día en pacientes de más de 40 años para mejorar la calidad endometrial.

Las tasas de embarazo con donación de ovocitos son generalmente más altas que las conseguidas por FIV-TE convencional¹⁸. La mayoría de los autores creen que las tasas de embarazo en la donación de ovocitos son tan buenas debido a la ausencia de hiperestimulación endometrial y a las mínimas alteraciones debidas a la infertilidad como causa de falla en la calidad ovular, por ejemplo, en pacientes con endometriosis pélvica ya sea leve o severa (grado IV de AFS) se sabe que se encuentra alterado el proceso y la calidad ovulatoria e incluso el mismo ovocito, cuando son receptoras de óvulos donados, el índice de implantación y embarazo es similar a las pacientes sin endometriosis pélvica, esto comprueba que la endometriosis como tal no afecta el proceso de implantación, pero si la ovulación, fertilización y transporte de los gametos¹⁹.

Muchos son los estudios que se han realizado recientemente en relación con la receptividad endometrial, la cual se puede disminuir por varias causas como una luteinización temprana o una baja respuesta a la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos, por lo cual se ha investigado una sustancia antiprogéstina (RU486) que puede corregir la luteinización precoz del endometrio y mejorar la receptividad aumentando las tasas de éxito de los ciclos de estimulación ovárica, desgraciadamente, la aplicación práctica más extendida actualmente de esta sustancia en los países Europeos, es como abortivo, ya que por su alta selectividad sobre los receptores de progesterona en los que funciona como antagonista, provoca en pocas horas el colapso vascular y glandular en todo el endometrio provocando desprendimiento del sitio de implantación²⁰.

Se están utilizando así mismo los implantes subdérmicos de estradiol de 100-250 mg que se colocan desde seis hasta 13 semanas antes de la donación, principalmente en pacientes con baja respuesta en el crecimiento endometrial con el uso de los esquemas habituales de reemplazo hormonal con esta liberación subdérmica de estradiol se han observado altas tasas de implantación y embarazo en este tipo de pacientes²¹.

Los niveles altos de progesterona en la donadora se han visto relacionados con decremento en la calidad de los ovocitos y los preembriones, lo cual disminuye las tasas de embarazo, por lo que se deberá poner especial énfasis en medir los niveles séricos de progesterona el día de la aplicación de la HCG²².

La donación de óvulos a pesar de ser una alternativa excelente en reproducción asistida como pilar fundamental para el manejo de las pacientes con decremento o pérdida de la función ovárica, se ha estado utilizando en los últimos tiempos, más allá de los que pudiera ser naturalmente aceptable, estando con esto sobrepasando los límites propios de la vida y aumentando los riesgos presentes y futuros tanto para una madre mayor de 50 años, como para el producto de ese embarazo, iniciando con los riesgos físicos de un embarazo a mayor edad y terminando con la disminución en las expectativas de calidad de padres que se ofrecen a ese nuevo individuo, en fin, aumentando la morbilidad-mortalidad materno-fetal a un grado que puede llegar a ser ética, moral y médicamente no aceptable^{23,24,25}.

La ética juega un papel crucial en estos procedimientos y debido a que existen varios tipos de donadoras (ocasionales, relacionadas o conocidas de las receptoras, pacientes de FIVTE y las profesionales), y cada una tiene sus propias motivaciones, resistencias, ventajas y desventajas, se han formado comités que han analizado estos puntos y han llegado a la conclusión de que deberá ser aceptada la donación por su alta eficacia en sus resultados siempre y cuando no exista ningún tipo de presión hacia la donadora. La remuneración o pago, no es posible estandarizarlo y es muy variable, así mismo se ha comprobado que los problemas familiares en la donación de conocidas son mayores y con más repercusión que con las donadoras anónimas en el niño cuando sale a la luz el origen de la donación, sin embargo los diferentes comités de ética han concluido que aunque se prefiere la donación anónima, la decisión final, deberán realizarla los futuros padres^{26,27} sin embargo el costo-beneficio para la pareja receptora es altamente satisfactorio, con la ventaja de que no importa la edad, el diagnóstico ni el tiempo de esterilidad, observándose los mismos índices de embarazo e implantación^{9,28}.

Otras aplicaciones ética y moralmente aceptables, son las pacientes portadoras de enfermedades genéticamente transmisibles y algunos síndromes como es en pacientes con síndrome de Turner en que se tiene tasas altas de implantación, aunque también tasas altas de pérdidas tempranas por anomalías anatómicas uterinas como hipoplasias y úteros bicórnos o tabicados, relacionadas con este síndrome²⁹.

Respecto a las donadoras es importante valorar que las donadoras hermanas de una paciente con pobre respuesta en ciclos previos de hiperestimulación ovárica, será mala candidata para la donación, ya que se han observado baja tasa de embarazos, relacionada con baja recuperación de ovocitos³⁰, además se ha demostrado que las pacientes pobres respondedoras no se ven beneficiadas aún con altas dosis de menotropinas en programa de reproducción asistida y si se eleva mucho el costo del procedimiento³¹, situación que no sucede cuando se emplean donadoras anónimas para este tipo de pacientes en que se informan tasas altas de

Tabla No. 5.
Experiencia con donación de óvulos en E.U. según la SART.

Año	No. Clínicas	Embriones Transferidos	Embarazos Clínicos	%	Nacimientos	%
1987	17	60	12	20	11	18
1990	67	547	160	29	122	22
1994	163	2,758	1139	41	929	34

implantación y embarazo y esto se mejora aún mas si se realiza transferencia de los preembriones donados en un ciclo "Natural" de la receptora¹².

En nuestro estudio, la diferencia encontrada en las tasas de embarazo entre las donadoras anónimas y las conocidas, fue altamente significativa, pues disminuye de un porcentaje de embarazo de 61.1% en receptoras que recibieron óvulos de donadoras anónimas, hasta 34.6% en las que lo hicieron de donadoras conocidas, esto principalmente se debe a que las donadoras hermanas de las receptoras son generalmente mujeres mayores de 30 años, que aunque sus perfiles hormonales de reserva ovular se mantengan en límites normales, el microambiente interno del ovario y la calidad de los ovocitos, no será la óptima para un proceso de donación.

Por otra parte, los índices de implantación y embarazo en nuestro estudio están dentro de los rangos informados a nivel mundial en este tipo de procedimientos según el reporte mundial de Técnicas de Reproducción Asistida (T.R.A.) presentado en el X congreso Mundial de Reproducción Asistida en Vancouver Canadá en Mayo de 1997 en el que se informan 6.166 casos de donación en 1995 en todo el mundo (FIVTE:141.190: GIFT:9,148: ICSI:47,654), con tasas de recién nacidos vivos entre 30-40%.

En la actualidad, el número de clínicas de Reproducción Asistida en todo el mundo se han incrementado y con ello el manejo de donación de óvulos a ido adquiriendo mayor aceptación por sus excelentes resultados. En México, aunque no están aún bien formalizados los programas de donación de óvulos, ante el crecimiento nacional en el número y calidad de este tipo de Centros de Reproducción Humana se vislumbra un futuro mas concreto en este tipo de técnica debido principalmente al beneficio en las tasas de embarazo y a la disminución del costo en la hiperestimulación ovárica. En la tabla 5 la Sociedad Americana en Técnicas de Reproducción Asistida (SART), muestra la experiencia que con donación de óvulos se ha tenido en Estados Unidos en los últimos años.

CONCLUSIONES

Podemos concluir que los procedimientos de donación de óvulos son un pilar en los programas de reproducción asistida y que ofrecen el gran beneficio de mejorar el índice de recién nacidos vivos así como la disminución de los costos del ciclo de hiperestimulación.

En la actualidad hay mucho por investigar para mejorar aún mas los índices de implantación, como es la estructura

y comportamiento endometrial con los diferentes regímenes de manejo así como mejorar la calidad ovular y de los preembriones.

Nuestros resultados se encuentran dentro de los porcentajes informados a nivel mundial, tanto en índice de implantación como en tasas de embarazo y recién nacidos vivos.

No encontramos diferencia en el índice de implantación y embarazo de acuerdo al tipo de procedimiento, edad y diagnóstico pero se observó una disminución significativa en las tasas de embarazo cuando el procedimiento se realizó con óvulos provenientes de una donadora conocida o traída a nuestro programa de reproducción por la receptora, esto debido principalmente a que se trata de donadoras generalmente mayores de 30 años y/o hermanas de pacientes con diagnóstico de pobre respuesta ovárica que se ha visto relacionada con disminución en la recuperación ovular.

Entonces, se deberá poner mas énfasis en el control de la aceptación de las donadoras familiares de las receptoras, para siendo estrictos en los criterios de inclusión poder contribuir a mejorar el resultado final de nuestros procedimientos.

Referencias

1. Luca Bernal, Italo Cluff, José P. Balmaceda: *Donación de ovocitos y madres surrogas: modelos para valorar las variables que afectan a los índices de implantación de embriones*. Reproducción Humana.
2. Lunnenfeld Z et al. *Premature Ovarian Failure. The prognostic application of autoimmunity on conception after ovulation induction*. Fertility and Sterility. 1993; 59(4): 750-5.
3. American Society for reproductive medicine. *Age related infertility. Guideline for practice*.
4. Check J, et al: *The effect of endometrial thickness and echo pattern on in vitro fertilization outcome in donor oocyte-embryo transfer cycle*. Fertil Steril. 1993; 59(1): 750-5.
5. José Remohi, Ernesto Gallardo, Antonio Gutierrez, Pedro Pablo Guanes, Fidel Cano: *Donación de ovocitos*. Reproducción Humana.
6. Asch RH, Balmaceda J, Ord, T, Borrero C, Cefalu E, Gastaldi C, Rojas: *Oocyte donation and gamete intrafallopian transfer in premature ovarian failure*. F. Fertil Steril 1988; 49: 263-6.
7. Abdalla H, Leonard T: *Cryopreserved Zygote intrafallopian transfer of anonymous oocyte donation*. Lancet 1988; 1: 835.
8. *Oocyte donation: indications and results* M.V. Sauer 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction Vancouver, Canada 24-28 May 1987
9. Remohi J, Gartner B, Gallardo E, Yaili S, Simon C, Pellicer: *Pregnancy and birth rates after oocyte donation*. A. In: Fertil Steril (1997 May) 67(4): 717-23.
10. Stolwijk AM, Zielhuis GA, Sauer MV, Hamilton CJ, Paulson RJ: *The impact of the woman's age on the success of standard and donor in vitro fertilization*. In: Fertil Steril (1997 Apr) 67(4): 702-10.

11. Escárcega P, Montemayor R, García E, Hernández A, Galache V, Santos R: *Donación de óvulos: Alternativa en reproducción asistida. Comparación de resultados*. VI Congreso Nacional Ginecología y Obstetricia. Mazatlán Sin.
12. Abdalla III, Burton G, Kirkland A, Johnson MR, Leonard T, Brooks AA, Studd J.W.W: *Age, Pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors*. Human Reprod 1993; 8: 1512-1517. Navot D, Drews MR, Bergh PA, et al.
13. Navot D, Drews MR, Bergh PA, et al: *Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation*. Fertil Steril 1994; 61: 97-101.
14. Sauer MV, Paulson R, Lobo RA: *Pregnancy after age 50: application of oocyte donation to women after natural menopause*. Lancet 1993; 341: 321-323.
15. Sauer MV, Miles RA, Dahamouh L, Paulson RJ, Pres M, Moyer D: *Evaluating the effect of age on endometrial responsiveness to hormone replacement therapy: a histologic, ultrasonographic and tissue receptor analysis*. J Asst Reprod Genet 1993; 10: 47-52.
16. Batista MC, Carledge TP, Merino MH, et al: *Midluteal phase endometrial biopsy does not accurately predict luteal function*. Fertil Steril 1993; 59: 294-300.
17. Levran D, Ben-Shlomo I, Dor J, Ben-Rafael A, Neber L, Maxhiach S: *Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model*. Fertil Steril 1991; 56: 1091-1094.
18. Society for Assisted Reproductive Technology: *The American Fertility Society. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology generated from the American Fertility Society registry*. Fertil Steril 1993; 59: 958-962.
19. L, Mukherjee T, Takeshige T, Bustillo M, Copperman AB: *Endometriosis is not detrimental to embryo implantation in oocyte recipients*. In: J Assisted Reproduction and Genetics (1997 Mar) 14(3): 152-6.
20. Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA: *Potential enhancement of endometrial receptivity in cycles using controlled ovarian hyperstimulation with antiprogesterins: a hypothesis*. In: Fertil Steril (1997 Feb) 67(2): 321-5.
21. Dmowski WP, Michalowska J, Rana N, Friberg J: *Subcutaneous estradiol pellets for endometrial preparation in donor oocyte recipients with a poor endometrial response*. In: J. Assist Reprod Genet (1997 Mar) 14(3): 139-44.
22. Israel Yovel, M.D.; Yuval Yaron, M.D.; Ami Amit, M.D.; M Ruben Peyser, M.D.; Menachem P. David, M.D.; Abraham Kogosowski M.D. Joseph B. Lessing, M.D.: *High progesterone levels adversely affect embryo quality and pregnancy rates in invitro fertilization and oocyte donation programs*. Fertil Steril (1995 July) 64(1): 128-131.
23. Paulson RJ, Thonton MH, Francis MM, Salvador HAS: *Successful pregnancy in a 63-year-old woman*. In: Fertil Steril (1997 May) 67(5): 949-51.
24. Yuval Yaron, M.D.; Ami Amit, M.D.; Steven M. Brenner, M.D.; M. Reuben Peyser, M.D.; Menachem P. David, M.D.; Joseph B. Lessing, M.D.: *In vitro fertilization and oocyte donation in women 45 years of age and older*. Fertil Steril vol. 63, No. 1, January 1995.
25. *Oocyte donation: ethical, legal and religious aspects*. J.G. Schenker 10th World Congress on in vitro Fertilization and Assisted Reproduction Vancouver, Canada 24-28 May 1997.
26. Yuval Yaron, M.D.; Ami Amit, M.D.; Steven M. Brenner, M.D.; M. Reuben Peyser, M.D.; Menachem P. David, M.D.; Joseph B. Lessing, M.D.: *(Oocyte donation: ethical aspects related to the donor)*. Don d'ovocyte: aspects éthiques liés à la donneuse. In: Contract Fertil Sex (1997 Mar) 25(3): 251-7.
27. Shenfield F, Steele SJ: *What are the effects of anonymity and secrecy on the welfare of the child in gamete donation?* In: Hum Reprod (1997 Feb) 12(2): 392-5.
28. Legro RS, Shackleford DP, Moessner JM, Gnatuk CL, Dodson WC: *ART in women 40 and over. Is the cost worth it?* In: J Reprod Med (1997 Feb) 42(2): 76-82.
29. Khastgir G, Abdalla H, Thomas A, Korea L, Latache L, Studd J: *Oocyte donation in Turner Syndrome: an analysis of the factors affecting the outcome*. In: Hum. Reprod (Feb 1997) 42(2): 76-82.
30. Sung L, Bustillo M, Mukherjee T, Booth G, Karstad A, Copperman AB: *Sisters of women with premature ovarian failure may not be ideal ovum donors*. In: Fertil Steril (1997 May) 67(5): 912-6.
31. Land Y, Yarmolinskaya M, Dumoulin J, Evers J: *High-dose human menopausal gonadotropin stimulation in poor responders does not improve in vitro fertilization outcome*. Fertil Steril (1996 May) 65(5): 961-5.
32. Lindheim SR, Vidali A, Dittkoff E, Sauer MV, Zinger M: *Poor responders to ovarian hyperstimulation may benefit from an attempt at natural-cycle oocyte retrieval*. In: J Assist Reprod Genet (1997 Mar) 14(3): 174-6.