UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA

" PARAMETROS BIOQUIMICOS DEL LIQUIDO FOLICULAR Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE LOS OVOCITOS "

TESIS DOCTORAL

RAMON P. MOLINA FERNANDEZ

GRANADA, 1989

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 1989 a 1990 Folio 70 vta Número 141

Reunido en el dia de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Ramón P. Molina Fernández, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente habia elegido: "Parámetros bioquímicos del líquido folicular y su relación con la fertilización in vitro de los ovocitos"

Terminada la lectura y contestadas la objecciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este le calificó de Apto "cum laude"

Granada 12 de Enero de 1990

EL PRESIDENTE,

Fdo.: J. González-Merlo

El Secretario del Tribunal

Fdo.: [illegible]

EL VOCAL,

Fdo.: Pedro de [illegible]

EL VOCAL,

Fdo.: [illegible] García Olivares

EL VOCAL,

Fdo.: Pío Panilla

FIRMA DEL GRADUANDO

Dpto. de Obstetricia y Ginecología

D. FRANCISCO GONZALEZ GOMEZ, CATEDRATICO DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICA:

Que D. RAMON P. MOLINA FERNANDEZ ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema "PARAMETROS BIOQUIMICOS DEL LIQUIDO FOLICULAR Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE LOS OVOCITOS", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, 6 de Noviembre de 1989

Fdo: Francisco González Gómez

D. ALFONSO J. HERRUZO NALDA, PROFESOR TITULAR Y JEFE DEL DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGIA DEL HOSPITAL REGIONAL " VIRGEN DE LAS NIEVES " GRANADA.

CERTIFICA:

Que D. RAMON P. MOLINA FERNANDEZ ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema "PARAMETROS BIOQUIMICOS DEL LIQUIDO FOLICULAR Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE LOS OVOCITOS", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, 6 de Noviembre de 1989

Fdo: Alfonso J. Herruzo Nalda

D. JOSE ANTONIO CASTILLA ALCALA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que D. RAMON P. MOLINA FERNANDEZ ha realizado bajo mi dirección su trabajo de Tesis Doctoral sobre el tema "PARAMETROS BIOQUIMICOS DEL LIQUIDO FOLICULAR Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE LOS OVOCITOS", que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido revisada la presente y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Granada, 6 de Noviembre de 1989

Fdo: José Antonio Castilla Alcalá

Quiero agradecer a D. Francisco González Gómez su orientación y consejos, y el interés puesto en el presente trabajo.

A D. Alfonso Herruzo Nalda su ayuda y compresión en los momentos difíciles durante la realización de esta tesis y sobre todo la confianza que ha depositado en mi.

A D. José A. Castilla Alcalá su ayuda en la enseñanza de las técnicas de este trabajo, su inapreciable colaboración y amistad.

A D. Francisco Vergara Sánchez sus enseñanzas sobre Reproducción Humana, sus consejos y apoyo en este trabajo.

A D. Jorge Bolaños y D. José A. Esquivel sus consejos en la parte estadística.

A D. Juan Hernández su ayuda y asesoramiento en la parte bioquímica.

A mi sobrina Dori Granados su ayuda en la mecanografía de esta tesis.

Al personal del Servicio de Análisis Clínicos, Medicina Nuclear y del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Regional "Virgen de las Nieves", especialmente a los de la Unidad de Reproducción por toda la colaboración prestada, que ha sido mucha.

Y a todos aquellos que con su apoyo han hecho posible este trabajo.

A MAITE y

mis hijos

A mis padres

y hermanos

INDICE

INTRODUCCION 1

I.- HISTORIA 2

II.- CONCEPTO 4

III.- INDICACIONES DE FIV - TE 5

III.1.- ENFERMEDADES DE LAS TROMPAS 5

III.2.- FACTOR MASCULINO 7

III.3.- ENDOMETRIOSIS 8

III.4.- ESTERILIDAD DE ORIGEN INMUNOLOGICO 9

III.5.- ESTERILIDAD SIN CAUSA APARENTE 9

IV.- ESTIMULACION OVARICA 10

IV.1.- FISIOLOGIA OVARICA 11

IV.1.1.- NEUROENDOCRINOLOGIA 11

IV.1.1.1.- [illegible]n - RH 11

IV.1.1.2.- HORMONAS HIPOFISARIAS 14

IV.1.2.- CICLO MENSTRUAL Y DESARROLLO FOLICULAR 18

IV.1.2.1.- FASE FOLICULAR 19

IV.1.2.2.- OVULACION 31

IV.1.2.3.- FASE LUTEA 34

IV.1.3.- PEPTIDOS OVARICOS 37

IV.2.- ESTIMULACION OVARICA 38

IV.2.1.- ESTIMULACION CON CITRATO DE CLOMIFENO 40

IV.2.2.- ESTIMULACION CC/hMG/hCG 42

IV.2.3.- ESTIMULACION CON GONADOTROFINAS 43

IV.2.3.1.- hMG/hCG 44

IV.2.3.2.- FSH/hMG/hCG 45

IV.2.3.3.- FSH/hCG 45

IV.2.4.- ANALOGOS DE LA Gn - RH 46

IV.2.5.- OTROS PROTOCOLOS 48

IV.2.6.- CONTROL DE LA RESPUESTA OVARICA 48

V.- PUNCION FOLICULAR 50

V.1.- LAPAROSCOPIA 51

V.2.- ECOGRAFIA 52

V.3.- LAPAROTOMIA 53

VI.- LABORATORIO DE FERTILIZACION IN VITRO 53

VI.1.- IDENTIFICACION Y CLASIFICACION DE LOS OVOCITOS 53

VI.1.1.- CLASIFICACION DE L. VEECK 55

VI.1.2.- CLASIFICACION DE J. TESTART 61

VI.1.3.- CLASIFICACION DE R. MARRS 61

VI.2.- PREPARACION DEL SEMEN 62

VI.3.- INSEMINACION 65

VI.4.- SIGNOS DE FECUNDACION 68

VI.5.- PRIMERAS DIVISIONES DEL EMBRION 70

VII.- TRANSFERENCIA EMBRIONARIA 71

VIII.- FASE LUTEA EN CICLO ESTIMULADO 74

IX .- LIQUIDO FOLICULAR 77

IX.1.- CARACTERISTICAS GENERALES 78

IX.1.1.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS. 78

IX.1.2.- PROTEINAS 79

IX.1.3.- LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS 81

IX.1.4.- HORMONAS 81

IX.1.5.- ENZIMAS 83

IX.1.6.- PROTEOGLICANOS 84

IX.2.- MARCADORES EN LF DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS 85

IX.2.1.- PARAMETROS FISICO-QUIMICOS 86

IX.2.1.1.- VOLUMEN DEL LF 86

IX.2.1.2.- VISCOSIDAD E INDICE DE REFRACCION 86

IX.2.1.3.- ABSORBANCIA ESPECTROFOTOMETRICA 87

IX.2.1.4.- ECOS INTRAFOLICULARES ... 87

IX.2.2.- PARAMETROS HORMONALES 88

IX.2.2.1.- ESTEROIDES SEXUALES 88

IX.2.2.2.- HORMONAS HIPOFISARIAS ... 90

IX.2.2.3.- CORTISOL 92

IX.2.2.4.- INSULINA Y HORMONA DEL CRECIMIENTO 93

IX.2.2.5.- OTRAS HORMONAS 94

IX.2.3.- MARCADORES BIOQUIMICOS 95

IX.2.3.1.- ELECTROLITOS GLUCOSA, AC. URICO Y ALGUNAS ENZIMAS . 95

IX.2.3.2.- COLESTEROL 96

IX.2.3.3.- FOSFATASA ACIDA 96

IX.2.3.4.- FIBRINOGENO 97

IX.2.3.5.- TRANSFERRINA 98

IX.2.3.6.- APOLIPOPROTEINA E 99

IX.2.3.7.- GLICOSAMINOGLICANOS 99

IX.2.3.8.- SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA 100

IX.2.3.9.- α-1 ANTITRIPSINA 101

IX.2.4.- MARCADORES INMUNOLOGICOS 102

IX.2.4.1.- LINFOCITOS 102

IX.2.4.2.- ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA . 103

IX.2.4.3.- TIMOSINA α-1 103

IX.2.4.4.- Ig G 104

IX.2.4.5.- PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS 104

IX.2.5.- ANALISIS DE LAS SUSTANCIAS SECRETADAS POR LAS CELULAS DE LA GRANULOSA IN VITRO 104

IX.2.5.1.- PROTEINAS 104

IX.2.5.2.- ESTEROIDES 105

IX.2.6.- OTROS MARCADORES 108

IX.2.6.1.- PROSTAGLANDINAS 108

IX.2.6.2.- PROTEINAS PLACENTARIAS .. 109

IX.2.6.3.- AMPc 110

IX.2.6.4.- ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO 110

IX.2.6.5.- PROTEINA REGULADORA FOLICULAR 111

IX.2.6.6.- INHIBIDOR DE LA MADURACION DEL OVOCITO 111

IX.2.6.7.- ß-ENDORFINAS 112

IX.2.6.8.- LAMININA P_1 Y PROCOLAGENA TIPO III 113

IX.2.6.9.- HISTAMINA 113

IX.2.6.10.- ESTUDIO CITOLOGICO 114

IX.2.6.11.- CA - 125 114

IX.2.6.12.- SHBG Y CBP 115

IX.2.6.13.- ACTIVADOR PROTEASA SOBRE EL COLAGENO TIPO IV DE LAS M. BASALES ... 115

OBJETIVOS 117

MATERIAL Y METODO 119

I.- INSTRUMENTOS Y REACTIVOS 120

I.1.- INSTRUMENTOS 120

I.2.- MATERIAL DESECHABLE 121

I.3.- REACTIVOS 122

II.- FARMACOS 122

II.1.- ESTIMULACION OVARICA 122

II.2.- ANESTESIA EN LA LAPAROSCOPIA 123

III.- METODO 123

III.1.- PROTOCOLO DE ESTIMULACION 123

III.2.- PUNCION FOLICULAR 124

III.3.- LABORATORIO DE FERTILIZACION IN VITRO. 127

III.3.1.- IDENTIFICACION Y CLASIFICACION DE LOS OVOCITOS 127

III.3.2.- PREPARACION DEL SEMEN 128

III.3.3.- INSEMINACION 130

III.3.4.- SIGNOS DE FECUNDACION 130

III.3.5.- PRIMERAS DIVISIONES DEL EMBRION 131

IV.- LIQUIDOS FOLICULARES 131

IV.1.- LF DE OVOCITOS NO FECUNDADOS 132

IV.2.- LF DE OVOCITOS FECUNDADOS 132

V.- METODOS BIOQUIMICOS 133

V.1.- HORMONAS 133

V.1.1.- ESTRADIOL Y PROGESTERONA 133

V.1.2.- FSH, LH Y PRL 134

V.2.- INMUNOGLUBULINAS, C3 Y C4 134

V.3.- OTRAS PROTEINAS 135

V.4.- ENZIMAS 135

V.5.- PERFIL LIPIDICO 136

V.5.1.- TRIGLICERIDOS Y COLESTEROL TOTAL. 136

V.5.2.- LIPOPROTEINAS 136

V.5.3.- APOLIPOPROTEINAS A Y B 137

VI.- METODOS ESTADISTICOS 137

VI.1.- CALCULO DE LOS VALORES MEDIOS Y SU DESVIACION ESTANDAR 137

VI.2.- TEST DE D' AGOSTINO 138

VI.3.- ANALISIS DE LA VARIANZA DE UNA VIA 139

VI.4.- CORRELACION LINIAL SIMPLE 140

RESULTADOS 142

DISCUSION 288

I.- CAPACIDAD DE FERTILIZACION DEL OVOCITO ... 292

II.- PREDICCION DEL DESARROLLO EMBRIONARIO 313

CONCLUSIONES 316

BIBLIOGRAFIA 319

INTRODUCCION

1.- **HISTORIA:**

Los primeros trabajos de experimentación para llegar a la técnica de Fertilización "in vitro" y transferencia de embriones fueron realizados por HEAPE en 1890, que mediante lavado de los oviductos de una coneja, recogió embriones preimplantatorios y los transfirió al útero de otra coneja receptora de una especie diferente, consiguiendo que nacieran conejos normales de la primera especie.

HAMMON (1949) consiguió cultivar embriones de ratón "in vitro" sin alterar su desarrollo. Posteriormente WHITTEN (1957) simplificó mucho los medios de cultivo que se habían utilizado hasta entonces, pero fue un año después cuando se consiguió el nacimiento de ratones normales después de cultivar "in vitro" los embriones de ratón y transferirlos al útero (McLAREN y BIGGERS, 1958).

El descubrimiento del fenómeno de la capacitación en los gametos masculinos de los mamíferos por CHANG (1951) y AUSTIN (1951) fue de enorme importancia para el desarrollo de estos trabajos.

Los primeros estudios sobre maduración de ovocitos humanos "in vitro" fueron publicados por EDWARDS (1965b), aunque estos trabajos se iniciaron en 1960. EDWARDS y col. (1969) publican sus resultados sobre fecundación y desarrollo de embriones humanos "in vitro". Un año después STEPTOE y EDWARDS, (1970) describe la técnica de recogida de ovocitos por laparoscopia, trás estimular el ovario con gonadotrofinas.

Este grupo vió recompensado su trabajo en 1976 al conseguir una gestación después de la transferencia de un embrión fecundado "in vitro", aunque fue un embarazo ectópico (STEPTOE y EDWARDS, 1976). El 25 de julio de 1978 nació mediante cesárea Louise Brown, el primer ser humano nacido de una fertilización "in vitro" (EDWARDS y col.,1980).

A partir de ese nacimiento la técnica de EDWARDS Y STEPTOE se extendió por todo el mundo apareciendo nuevos grupos que la realizan con éxito. En España la primera gestación mediante un programa de fertilización "in vitro" tuvo lugar en 1984 en la Unidad de Reproducción Humana del Instituto Dexeus de Barcelona (BARRI y col., 1984).

II. - **CONCEPTOS** :

La Fecundación in Vitro y Transferencia de Embriones (FIV-TE) se define como la fecundación de los ovocitos fuera del cuerpo humano, el cultivo de los embriones en sus primeras etapas y la posterior implantación de los embriones en el útero de la mujer.

Para un mejor estudio la técnica de FIV-TE se puede dividir en varias etapas:

A.- Indicaciones de FIV-TE.

B.- Estimulación ovárica.

C.- Punción Folicular.

D.- Laboratorio:

- Identificación y clasificación de los ovocitos.
- Preparación del semen e inseminación.
- Observación de los signos de fecundación.
- Primeras divisiones.

E.- Transferencia embrionaria.

A continuación referimos esas etapas.

III.- INDICACIONES DE FIV-TE :

Los criterios generales de selección de pacientes para este tratamiento no se diferencian prácticamente de los seguidos para otras terapias en esterilidad. Se sabe que en los programas FIV-TE la tasa de fecundación disminuye y la tasa de abortos aumenta con la edad de las pacientes (EDWARDS y STEPTOE, 1983).

Un equilibrio psicoemocional óptimo es también una premisa importante para aceptar a una pareja en el programa, ya que, su historia previa de tratamientos fracasados de la esterilidad, y el ser conscientes de que es la última posibilidad que tienen para alcanzar una gestación, las hace extremadamente vulnerables a la ansiedad (FREEMAN y col., 1985; GREENFEL y col., 1986).

III.1.- ENFERMEDADES DE LAS TROMPAS :

La principal indicación en todos los programas de FIV-TE es la patología tubárica. En nuestra unidad, hasta el año 1987, el 91 % de las pacientes admitidas al programa FIV-TE lo fueron por patología tubárica (MOLINA, y col., 1988d). Este porcentaje va disminuyendo al ir aumentando la aceptación de parejas con otras indicaciones. En la actualidad en nuestro programa la

patología tubárica no llega al 80 %. Pero, a pesar de esta disminución, el factor tubárico sigue siendo la causa más frecuente para realizar una FIV-TE en todos los equipos.

La tasa de fertilización (porcentaje de ovocitos que se fecundan) de las pacientes con patología tubárica es la más alta en los programas FIV-TE. (VAN UEM y col., 1985; BELAISCH-ALLART y FENEUX, 1988)

La tasa de éxitos en estas pacientes no es, sin embargo, la mayor dentro de un programa de FIV - TE, en contra de lo que podía esperarse (JONES, 1986). Esto posiblemente esté condicionado por la cirugía previa que las pacientes han sufrido extirpándoles totalmente un ovario e incluso, en algunos casos, parte de la otra gónada. Autores como MOLINA y col. (1988a) no observan influencias en la tasa de éxitos en las pacientes con salpinguectomía previa, pero encuentran diferencias en el número de ovocitos obtenidos, la tasa de fertilización y la de éxitos cuando la cirugía previa ha extirpado completamente una gónada o ha extirpado tejido de los dos ovarios.

III.2.- FACTOR MASCULINO :

El factor masculino es, actualmente, en esterilidad el problema que tiene menos posibilidades terapeúticas. En teoría la FIV-TE puede ayudar a estos pacientes al necesitarse un número menor de espermatozoides para fecundar los ovocitos que en la fecundación natural, sin embargo no hay acuerdo unánime sobre las cifras mínimas de los parámetros clásicos del seminograma para aceptar a un varón para un programa FIV-TE (VAN UEM y col., 1985; COHEN y col., 1985; FRYDMAN, 1986).

En la actualidad no se considera acreditada ninguna prueba para señalar con exactitud los límites entre los que considerar a un semen apto para FIV. El test de Penetración del Hamster, que despertó grandes esperanzas para predecir con rigor la fecundabilidad del esperma, parece haber perdido validez y, de hecho, autores como ROGERS y col. (1979) y MAGALIOTH y col. (1986), están a favor de su empleo; mientras que COHEN y col. (1982) y OVERSTREET y col. (1980) están en contra, por la falta de estandarización de la técnica, las variaciones importantes en los resultados obtenidos en un mismo individuo, la existencia de falsos positivos frecuentes y, sobre todo, de falsos negativos.

La tasa de fecundación en este grupo de parejas es muy baja, (VAN UEM y col., 1985; HIRSCH y col., 1986; BELAISCH-ALLART y FENEUX, 1988). Sin embargo la tasa de gestaciones por transferencia es similar a la que se obtiene en otras indicaciones de FIV-TE (JONES, 1986; BELAISCH-ALLART y FENEUX, 1988).

II.3.- ENDOMETRIOSIS:

La endometriosis es otra de las indicaciones de aceptación de pacientes en un programa FIV-TE. Todas las pacientes que se aceptan por endometriosis han sido previamente tratadas con medicamentos, quirúrgicamente o con ambos procedimientos sin haber conseguido un embarazo.

Distintos grupos han coincidido en demostrar peor tasa de gestaciones para aquellas mujeres con focos importantes de endometriosis en el momento de la laparoscopia, comparándolo con el de aquellas pacientes que con historia previa de endometriosis, tenían lesiones mínimas en el momento de la laparoscopia (CHILLIK y col., 1985; BARRI y col., 1988).

III.4.- ESTERILIDAD DE ORIGEN INMUNOLOGICO :

Diversos procesos inmunes pueden interferir en la reproducción humana normal (JONES, 1988). El más estudiado, sin lugar a dudas, son los anticuerpos antiespermatozoide, los cuales se han demostrado que reducen significativamente las posibilidades de fecundación (CLARKE y col., 1988; TSUKUI y col., 1988). Así, se ha visto una menor tasa de éxitos tras FIV-TE en mujeres con anticuerpos antiespermatozoides, que en otros grupos, siendo esto más evidente cuando dichos anticuerpos van dirigidos contra la cabeza del espermatozoide (MANDELBAUN y col., 1987).

III.5.- ESTERILIDAD SIN CAUSA APARENTE :

Por definición a estas pacientes se les ha realizado un estudio completo de esterilidad, incluyendo laparoscopia y estudio de anticuerpos antiespermatozoides en suero tanto del hombre como de la mujer, no identificándose ninguna causa que justifique la esterilidad.

Ciertos casos de esterilidad considerados en este grupo son debidos a que no se produce la fecundación. La falta de penetración al ovocito puede estar ligada a

anomalías de los gametos masculinos únicamente visibles por microscopía electrónica (FENEUX y col., 1986).

Teóricamente la FIV-TE puede solventar anormalidades ignoradas en el mecanismo de recogida y transporte de los gametos por la trompa, a la vez que también se evitan alteraciones cervicales y defectos en la fase folicular; no obstante, diferentes trabajos demuestran, en este grupo de pacientes, unas tasas menores de recogida de ovocitos preovulatorios y de fertilización respecto a pacientes con esterilidad tubárica (NAVOT y col., 1988; BELAISCH-ALLART y FENEUX, 1988).

IV.- ESTIMULACION OVARICA :

Para mejor comprender este capítulo debe repasarse, brevemente, la fisiología ovárica, la cual se dividirá en:

- Neuroendocronología
- Ciclo menstrual y desarrollo folicular.
- Péptidos ováricos

IV.1.- FISIOLOGIA OVARICA :

IV.1.1.- NEUROENDOCRINOLOGIA :

IV.1.1.1.- Gn-RH :

En el pasado se consideraba a la hipófisis como la glándula directora de la función reproductora. Posteriormente se la relegó a la función de orquesta siendo el director de ella el hipotálamo que responde a los mensajes del sistema nervioso central y periférico y ejerce una influencia sobre la hipófisis por medio de hormonas hipotalámicas enviadas a través de la circulación portal.

Datos recientes indican que el ciclo menstrual esta controlado por los esteroides sexuales, que produce el ovario. El hipótalamo es esencial para que estos mecanismos se realicen, pero el estímulo preciso que conduce a la ovulación es desencadenado por el retrocontrol de los esteróides sobre la hipófisis anterior (SPERGFF y col., 1986).

Determinadas células hipotalámicas segregan unas sustancias que se conocen como neurohormonas que son transportadas a la hipófisis a través del sistema de los vasos portales. La principal neurohormona que controla

las gonadotrofinas es un decapéptido denominado Gn-RH (hormona liberadora de gonadotrofinas), identificada por SCHALLY en 1971, que estimula la secreción de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

El principal grupo de cuerpos celulares que producen Gn-RH se encuentra en el hipotálamo mediobasal, siendo el núcleo arqueado el lugar fundamental; pero también se produce en los núcleos periventriculares y en el área preóptica media en el hipotálamo anterior (SILVERMAN y col., 1977). La liberación de Gn-RH se realiza por vía axónica por el tracto tuberoinfundibular a la circulación portal llegando por esta vía hasta la hipófisis anterior.

KNOBIL, (1980) en una serie de experimentos demostró que la secreción normal de gonadotrofinas requiere la descarga pulsátil de Gn-RH con una frecuencia y concentración dentro de unos límites críticos.

Está generalmente asumido que la Gn-RH se sintetiza formando parte de una gran molécula, que se compone de tres partes: señal peptídica, Gn-RH y péptido asociado a la Gn-RH (GAP), compuesto por 56 aminoácidos (FINK, 1988).

La mecanismos que regulan la secreción de Gn-RH se pueden dividir (WEINER y col., 1988) en :

- **Mecanismos centrales:**

  A - Neurotransmisores procedentes de centros nerviosos superiores.(Dopamina, NA, Serotonina, GABA, Histamina..)

  B.- Neuropéptidos : Moduladores de la respuesta. Muy numerosos son los más importantes:

  - Somatostatina, GAP-Gn-RH, Sustancia P, Neuroquininas
  - Neuropéptido-Y y Galanina
  - Oxitocina, Vasopresina, TRH, CRF..
  - Familia del Glucagón
  - Opioides.

- **Mecanismos periféricos:** Especialmente Estradiol, Progesterona y catecolestrógenos.

IV.1.1.2.- HORMONAS HIPOFISARIAS:

Las gonadotrofinas son hormonas segregadas en el lóbulo anterior de la hipófisis que actúan específicamente sobre las gónadas controlando tanto la función reproductora como la endocrina de estas. Existen como se sabe dos hormonas gonadotropas:

FSH : Hormona Folículo Estimulante.

LH : Hormona Luteinizante, también llamada en el varón estimulante de las células intesticiales.

Ambas gonadotrofinas son glucoproteínas formadas por dos subunidades polipeptídicas, α y ß. La cadena α es similar para la FSH y la LH e incluso similar a las de otras hormonas como la hCG (Gonadotropina Coriónica humana) producida por la placenta durante el embarazo. La actividad biológica de la hormona corresponde a la subunidad ß, pero tiene que estar unida a la cadena α para que exprese su actividad. La LH y la hCG tienen similitud en la cadena ß y por tanto una actividad similar llegando a sustituir la hCG a la LH en el uso clínico (PIERCE, 1988).

Hoy se acepta el concepto de que las gonadotrofinas presentan diferente actividad biológica según su composición química, aunque los valores por radioimunoaná-

lisis no cambien (VAITUKATIS y col., 1976). La actividad de la LH se modifica a lo largo del ciclo, siendo máxima, al parecer, durante el pico ovulatorio, momento en el que los valores biológicos e inmunológicos difieren considerablemente (MARUT y col., 1981). Existe, al parecer, una relación entre el contenido en ácido siálico, aclaramiento renal y actividad biológica (WIDE, 1982).

Su metabolismo es poco conocido siendo el hígado y el riñón quienes juegan el papel más importante. Su vida media es corta, aproximadamente, 3 horas para la FSH, 30 minutos para la LH y 6 horas para la hCG (PIERCE, 1988). Los receptores específicos para la acción de las gonadotrofinas se situan en el ovario, muy especialmente en las membranas célulares de la teca y de la granulosa.

La FSH presenta al comienzo del ciclo menstrual valores relativamente elevados que se vinculan con el reclutamiento folicular. A medida que se concreta el ascenso estrogénico por selección y dominancia del folículo (conceptos que se veran más adelante-Pag.19-), la FSH desciende y así completa la segunda mitad del periodo proliferativo, hasta producirse el pico ovulatorio, más moderado y coincidente con el de la LH. Después de la ovulación se mantiene en los niveles más bajos del ciclo, hasta que, al declinar el cuerpo amarillo, inicia

un aumento lento y moderado que coincide con el comienzo de la menstruación siguiente.

La LH tiene, en el ciclo, un perfil característico (FRITZ y SPEROFF, 1982). Sus valores son bajos al comienzo de la fase folicular y ascienden lentamente, entrecruzándose con la curva en descenso de la FSH en la mitad de este periodo. Posteriormente se observa un brusco aumento de la LH, denominado pico ovulatorio, cayendo posteriormente a valores inferiores a los de la fase folicular y permaneciendo así hasta el final del ciclo.

El hipotálamo ejerce un estímulo exclusivamente positivo, determinando la síntesis, depósito y movilización de las gonadotrofinas. Todo ello gracias a la secreción pulsátil de la Gn-RH de la que se habló anteriormente. Distintos estudios han demostrado la riqueza de receptores estrogénicos a nivel pituitario (MULDOON y col., 1982). En un efecto bifásico, el Estradiol (E_2) al comienzo del ciclo inhibiría la salida de las gonadotrofinas favoreciendo su depósito intracelular. Sus valores, en aumento progresivo, estimularían la formación de un mayor número de receptores pituitarios para Gn-RH, haciendo al gonadotropo cada vez más sensible al estímulo hipotalámico. La respuesta de la Hipófisis a la Gn-RH es proporcional a la concentración

y tiempo de exposición al Estradiol circulante (ADAMS y col., 1981).

También se ha demostrado que el decapéptido hipotalámico puede estimular sus propios receptores, aumentando la secreción de gonadotrofinas (PAGMANAGHAN y col., 1982). Llegando a un punto crítico, en el cual los niveles de Estradiol superan los 200 - 300 pg/ml, las células de la Hipófisis se encuentran con el mayor número de receptores para Gn-RH siendo los pulsos de esta neurohormona de una amplitud creciente, la LH se vuelca a la circulación en forma de gran oleada (retrocontrol positivo del Estradiol) (TOZZINI y PINEDA, 1988).

Se ha detectado un aumento de los niveles de Progesterona en las venas aferentes del ovario 24 a 48 horas antes de la ovulación y del lado en que se encuentra el folículo dominante (DiZEREGA y col., 1980). Este aumento es pequeño pero, al parecer, de considerable importancia fisiológica. Al actuar coordinadamente con la elevación estrogénica potenciaría la retroalimentación positiva del Estradiol, determinando una mayor amplitud del pico de LH. Su presencia, además, se vincularía con el pico coincidente de FSH (MARCH y col., 1981). Este pico de FSH que acompaña al de LH produce un número adecuado de receptores de LH en las células de

la granulosa, necesario para que el cuerpo lúteo sea normal (SPEROFF y col., 1986).

En la segunda fase del ciclo el aumento de estrógenos va acompañado de un aumento de Progesterona y esta última es capaz de impedir el efecto de incremento de biosíntesis de las gonadotrofinas que determinan los estrógenos aisladamente, no produciéndose su almacenamiento para originar un nuevo pico de LH (FINK, 1988). Parece que el mecanismo íntimo de este efecto esta mediado por la secreción a nivel de SNC de ß-endorfinas (BOUCHARD, 1987).

IV.1.2.- CICLO MENSTRUAL Y DESARROLLO FOLICULAR :

El ovario tiene una doble misión: la liberación periódica de ovocitos (foliculogénesis) y la secreción de hormonas, (hormonogénesis). Ambos procesos van ligados entre sí y dependen de una serie de cambios morfológicos y estructurales del propio ovario y de la dinámica existente entre hormonas hipofisarias y gonadales.

De manera somera describiremos a continuación el ciclo ovárico normal, que se puede dividir en tres partes: Fase folicular, ovulación y fase lútea

IV.1.2.1.- FASE FOLICULAR :

Durante esta fase se desarrolla una sucesión de acontecimientos que asegura que siempre este dispuesto un cierto número de folículos para la ovulación. La duración habitual de este proceso es de 10-14 días; supone una serie de acciones hormonales sucesivas sobre el folículo, que lo conducen a la ovulación, partiendo del folículo primordial y pasando por las fases de folículo primario, secundario o antral y preovulatorio.

FOLICULO PRIMORDIAL :

El folículo primordial está formado por un ovocito detenido en estadío de diplotene de la primera profase meiótica, desde antes del nacimiento de la mujer, rodeado de una sola capa de células de la granulosa y una membrana basal que separa estas estructuras del tejido adyacente. Cíclicamente un número de folículos primordiales parten del conglomerado en reposo e inician un patrón de crecimiento y desarrollo bien definido. A estos grupos de folículos en crecimiento sincrónico o casi sincrónico se denominan **cohorte folicular**. El número de folículos que componen una cohorte no se conoce (HODGEN,1982), dependiendo probablemente este número de los folículos residuales exis-

tentes. (FRITZ Y SPEROFF, 1982). En cada ciclo un sólo miembro de esta cohorte continua su desarrollo y escapa de la atresia llegando a convertirse en el folículo de DeGraaf, proporcionando el ovocito maduro. SCHWARTZ (1974) ha denominado a este patrón como la " **trayectoria del crecimiento folicular**".

GOODMAN y HODGEN (1983) introdujeron el término de **reclutamiento** para señalar que un folículo ha ingresado en la trayectoria de este crecimiento. El reclutamiento indica el desarrollo de los folículos primordiales.

El término **selección** indica que de la cohorte de folículos que se reclutaron se llega a un número igual al característico de la especie, mediante la atresia de los folículos en exceso; en la especie humana la cuota ovulatoria es de un sólo folículo.

El término de **dominancia** se utiliza para definir el folículo destinado a ovular, desempeñando por tanto un papel fundamental en la regulación de la cuota ovulatoria. Es funcionalmente dominante e inhibe el desarrollo de otros folículos competidores. Este folículo continua su desarrollo en un medio que se ha hecho inapropiado para otros.

Una vez que se pone en marcha el desarrollo folicular en los ovários ya no se detiene hasta que se han agotado todas las reservas de folículos primordiales; no interrumpiéndose este desarrollo ni con los ciclos anovulatorios ni con gestaciones, como lo prueba la respuesta a la estimulación con gonadotrofinas de los ovarios de pacientes gestantes (SERAFINI y col., 1985; DIAMOND y col., 1987).

La iniciación del crecimiento folicular parece ser un proceso intrínseco del ovario, e independiente de la estimulación gonadotrópica (ROSS, 1974). La mayor parte de estos folículos que inician su crecimiento terminarán en atresia.

FOLICULO PRIMARIO :

Una vez iniciado el desarrollo folicular el primer cambio que se detecta en el folículo reclutado es un incremento del tamaño del ovocito que pasa de 15 a 100 µm de diámetro, observándose en él un elevado nivel de actividad celular (CENTOLA, 1983). El ovocito en esta etapa se rodea de una capa, **la zona pelúcida**, producida posiblemente por las células de la granulosa, originada inicialmente a partir de un material amorfo que comienza a rellenar los espacios entre las microvellosidades del ovocito y de las células de la granulosa. Los espacios

concluyen uniéndose unos a otros para dar lugar a una zona amorfa y gruesa cuyo origen exacto no está aún completamente aclarado (WASSARMAN, 1988).

Durante la fase de Folículo Primario se desarrolla la teca interna, formada por pequeños núcleos de células productoras de hormonas esteroideas, incluidas en un tejido conectivo ricamente vascularizado. Esto implica que el folículo por primera vez está expuesto a las hormonas plasmáticas que contribuyen a una serie de modificaciones estructurales y bioquímicas que conducirán a la continuación del desarrollo folicular. Por tanto el crecimiento del folículo primario es totalmente dependiente de FSH y LH a diferencia del folículo primordial cuyo desarrollo lo es exclusivamente de factores intraováricos.

Aparecen en las células de la granulosa receptores para la FSH, inducidos por la propia gonadotrofina. Estas son las únicas células ováricas que poseen receptores para FSH (NIMROD y col.,1976), continuando estas células proliferando con lo que forman varias capas de ellas. También se detectan receptores para el Estradiol y para la Testosterona, tanto citosólicos como nucleares, en las células de la granulosa (SCHREIBER y ROSS, 1976).

Aparecen zonas de contacto altamente especializadas entre las membranas de las células de la granulosa, "gap junctions", que se suponen constituyen la base estructural para facilitar el intercambio celular de iones, AMP_c, hormonas esteroideas y otras sustancias. Estos contactos entre membranas han sido también demostrados entre el ovocito y las células de la granulosa (ANDERSON Y ALBERTINI, 1976).

El folículo primario o preantral dispone en su constitución de toda la estructura enzimática que producirá la síntesis de los esteroides. Esta capacitado, entonces, para la producción de Progesterona, andrógenos y estrógenos, y de hecho la lleva a cabo, aunque son los últimos los que se producen en mayores cantidades (HILLIER y col., 1977). En presencia de FSH el folículo, por medio de las células de la granulosa, comienza a aromatizar cantidades crecientes de andrógenos generando su propio microclima estrogénico (McNATTY y col., 1979b), que facilita la nueva síntesis de receptores para FSH y Estradiol (E_2) estimulando la multiplicación de las células de la granulosa, lo que a su vez multiplica el número de receptores para FSH y E_2. De este modo el folículo preantral incrementa su capacidad para producir estrógenos apoyándose en su continuo crecimiento.

La función de los andrógenos en el desarrollo folicular inicial es compleja, puesto que a dosis bajas estimulan a la enzima aromatasa, lo que provoca mayor cantidad de estrógenos; pero a dosis altas favorecen su conversión en otros andrógenos más potentes (McNATTY y col., 1979a) que ya no pueden aromatizarse a estrógenos e inhiben la actividad aromatasa (HILLIER y col., 1980).

La FSH tiene un importante efecto en el desarrollo del folículo preantral; el balance FSH/LH es transcendental ya que la producción de estrógenos por las células de la granulosa es un proceso mediado por la FSH, mientras que la producción de andrógenos por la teca depende de la LH. Así, un adecuado desarrollo y selección de los folículos dependerá de adecuadas concentraciones de FSH con niveles bajos de LH.

No está claro cuando comienza el reclutamiento de un grupo de folículos para que uno de ellos sea seleccionado para madurar y llegar al estado preovulatorio. Parece ser que estos hechos comienzan durante la fase lutea del ciclo anterior (TOZZINI y PINEDA, 1988), aunque otros autores la sitúan en ciclos anteriores (GREENWALD y TERRANOVA, 1988).

FOLICULO SECUNDARIO :

Bajo la acción sinérgica de estrógenos y FSH, el folículo continua aumentando de volumen. La multiplicación de las células de la granulosa determina la aparición de espacios confluentes que se van llenando de líquido folicular (ver sección IX) y desplazan al ovocito, rodeado de algunas capas de células de la granulosa, hacia un polo, para formar el cúmulo oóforo, alcanzando de este modo el estado antral.

La acumulación de líquido folicular y las uniones específicas entre las membranas de las células de la granulosa proporcionan un medio por el cual cada ovocito se encuentra en un microambiente endocrino específico para cada folículo (SPEROFF y col., 1986).

El incremento del nivel estrogénico, esencial para el crecimiento y desarrollo posterior del folículo, depende de la sensibilidad creciente a la FSH de las células de la granulosa y esto se consigue a través de una rápida acumulación de receptores de FSH por la acción continuada de la propia FSH y de los estrógenos.

El ambiente estrogénico es fundamental para que el folículo prosiga su desarrollo, ya que el E_2 y la FSH actuan sinérgicamente estimulando la proliferación y

síntesis de las células de la granulosa, al tiempo que inducen un rápido aumento de los receptores de FSH (RICHARDS, 1979). Estudios "in vitro" (McNATTY y col., 1979; BATTA y col., 1980) demuestran que es necesaria la colaboración de las células de la teca y de la granulosa del folículo para el rápido incremento en la producción de estrógenos que aparece al final de la fase folicular. Se trata de la teoría de las dos células que postuló FALCK en 1958, al observar que, autotransplantando células de la granulosa, de la teca y una combinación de ambos tipos de células en ratas castradas, sólo se producía secreción de estrógenos cuando se combinaban en el mismo cultivo células de la teca con las de la granulosa. SHORT en 1962 propuso la existencia de diferencias enzimáticas que se complementarían entre sí en las células de la teca y de la granulosa para explicar esta divergencia en la producción hormonal. Hoy se sabe que las células de la teca interna, que contienen receptores de LH producen andrógenos, estimuladas por la LH, los cuales pasan a las células de la granulosa en donde se aromatizan a estrógenos por influjo de la FSH.

Esta teoría de las dos células está actualmente en revisión puesto que se pueden obtener con FSH pura foliculogénesis y hormonogénesis correctas en ausencia de LH; al menos cuando la FSH se administra a dosis

suprafisiológicas a primates hipofisectomizados quirúrgicamente o después de hipofisectomía médica mediante análogos de la Gn-RH. Esto demuestra el papel predominante de la FSH y de las células de la granulosa sobre el de la LH y las células de la teca (CHARBONNEL, 1987).

La interacción entre FSH y estrógenos puede también desempeñar un papel en la selección del folículo destinado a ovular, proceso que, con raras excepciones, sólo tiene lugar en un folículo puesto que los estrógenos ejercen un influjo positivo sobre el folículo, al potenciar la acción de la FSH, pero influyen negativamente sobre el sistema hipotálamo-hipofisario, frenando el estímulo gonadotropo, la FSH, para los otros folículos menos desarrollados (ZELEZNIK, 1981). Este es un momento esencial del ciclo ovárico. Los estrógenos exógenos administrados incluso después de la selección del folículo dominante producen la interrupción del desarrollo preovulatorio y conducen a la atresia folicular, al reducir los niveles de FSH por debajo del nivel de mantenimiento (CLARK y col., 1981).

Una asimetría en la producción de estrógenos entre los dos ovarios se puede descubrir en sangre venosa ovárica en fases tempranas del ciclo, entre los días 5º al 7º, expresión de que la selección de un folículo se ha producido ya es el dominante. Esta fecha del ciclo

corresponde con el descenso gradual de los niveles de FSH que se observan en la mitad de la fase folicular. (DiZEREGA y col., 1980).

El folículo dominante proseguirá su crecimiento a pesar de esta disminución de la FSH debido a que su contenido en células de la granulosa y receptores de FSH es mayor que el de los demás folículos y su vascularización está más desarrollada por su capa de células de la teca (ZELEYNIK y col., 1981), siendo su producción de hormonas esteroideas mayor que la de los demás folículos en desarrollo.

Un elemento a tener en cuenta en la disminución de los niveles de FSH es la Inhibina, un péptido sintetizado por las células de la granulosa y enviado a la corriente ovárica eferente y al líquido folicular. La Inhibina ejerce una acción supresora sobre la FSH a nivel hipofisario y puede participar en las variaciones que se observan de esta gonadotrofina en el ciclo menstrual (CHANNING y col., 1981).

La Inhibina durante la fase folicular aumenta paralelamente a los estrógenos. Ha sido aislada por CHARI y col (1979) y está constituida por una cadena α y otra ß. Pero los conocimientos sobre esta hormona se complican por la evidencia en los líquidos foliculares

de un dímero formado por 2 cadenas ß de inhibina que estimula "in vitro" la secreción hipofisaria de FSH y parece que ejerce efectos paracrinos sobre el crecimiento folicular similares a TGF ß (CHARBONNEL, 1987; STEINBERGER Y WARD, 1988), por lo que todavía existe discusión acerca de su papel en la regulación del ciclo menstrual (FRANCHIMONT y col., 1988).

Por otra parte para poder responder a la descarga ovulatoria y llegar a convertirse en cuerpo lúteo idóneo las células de la granulosa deben adquirir receptores de LH, que estarán en relación directa con la actividad esteroideogénica del folículo y con la actividad de la FSH sobre el folículo en crecimiento.

Otro hecho que acompaña el desarrollo del folículo antral es la formación de receptores para Prolactina y prostaglandinas (TOZZINI y PINEDA, 1988). Los primeros son inducidos por la FSH en las células de la granulosa, aunque su concentración decrece a medida que el folículo se desarrolla (McNATTY y col., 1975; REINTHALLER y col., 1987). La presencia de los receptores de prostaglandinas, se relaciona con el proceso intrínseco de la ovulación (LE MAIRE y col., 1975).

FOLICULO PREOVULATORIO

En el folículo preovulatorio las células de la granulosa aumentan de tamaño e inician la producción de Progesterona, lo que se traduce al microscopio por la visualización de inclusiones de lípidos. Mientras las células de la teca también cambían de aspecto se vacuolizan y son ricamente vascularizadas, dando al folículo un aspecto hiperémico. El folículo produce grandes cantidades de estrógenos y de Inhibina por lo que la FSH llega a su nivel más bajo, mientras, por el contrario, la LH aumenta lentamente y después de forma rápida en forma de descarga, acompañándose de una elevación similar pero menor de FSH.

Al actuar sobre sus propios receptores la LH favorece la luteinización de las células de la granulosa, lo que origina la secreción de Progesterona. En las 24 - 48 horas que preceden a la ovulación, tiene lugar un aumento significativo de los niveles circulantes de Progesterona (MOGHISSI y col., 1972). Este pequeño aumento de los niveles de Progesterona en el periodo preovulatorio tiene una gran importancia fisiológica ya que, en presencia de una adecuada producción estrogénica, determina y modula el pico de FSH (MARCH y col., 1981) contribuyendo a la producción del pico de LH,

modulando su duración al afectar la respuesta de la hipófisis al retrocontrol positivo de los estrógenos.

Los folículos más pequeños que no llegan a la madurez sufren atresia, las células que formaban su teca retornan a su origen como componentes del tejido del estroma ovárico, pero responden a la LH produciendo andrógenos que explican el aumento de su nivel en la mitad del ciclo (ABRAHAM, 1974). El aumento de los niveles de andrógenos en esta fase del ciclo menstrual puede tener dos funciones: la primera, local, favoreciendo el proceso de atresia de los folículos y la segunda, general, estimulando la líbido (SPEROFF y col., 1986).

IV.1.2.2.- **OVULACION :**

La producción acelerada de estrógenos actua centralmente desencadenado el pico de LH, responsable directo de la ovulación. Es por tanto, el propio folículo el que induce el estímulo ovulatorio a través de la secreción de estrógenos. Para que se desencadene el pico de la LH los niveles de estradiol deben sobrepasar un umbral mínimo de 200 pg/ml y mantenerse elevados durante un mínimo de 50 horas (YOUNG y JAFFE, 1976).

El ovocito reanuda su primera meiosis antes de la ovulación. Los trabajos de SCHUETZ (1974) demuestran que existe desde la fase de folículo antral un factor en el líquido folicular que inhibe la meiosis del ovocito. A este factor se le conoce con el nombre de **inhibidor de la maduración del ovocito** (IMO). Es un polipéptido producido por las células de la granulosa, que no parece tener especificidad de especie. Este factor actua localmente de forma directa sobre las células del cúmulo y su síntesis está regulada por la concentración local de gonadotrofinas y esteroides. Parece existir una relación inversa entre el contenido de E_2, tamaño del folículo y producción de IMO (YING y col., 1981).

En el líquido folicular también aparece otro factor denominado inhibidor de la luteinización (LI), segregado por las células de la granulosa. Su misión sería impedir la luteinización temprana de éstas células (CHANNING, 1985).

La descarga de LH además de reanudar la meiosis en el ovocito, produce la luteinización de las células de la granulosa y la síntesis de prostaglandinas que son fundamentales para la ruptura del folículo. La Progesterona además de sus efectos a nivel central (visto anteriormente pag. 30) puede incrementar la distensibilidad de la pared del folículo. La LH, la Progesterona,

o ambas, favorecen la acción de enzimas proteolíticas como la colagenasa y la plasmina (LIPNER, 1988).

Las prostaglandinas (PG) E y F aumentan notoriamente en el líquido folicular preovulatorio, siendo su concentración máxima en la ovulación. La inhibición de las PG bloquea la ovulación. (O'GRADY y col., 1972). En el ovario se han identificado células de músculo liso y quizás las PG actuarían sobre ellas provocando su contracción, ayudando así a la expulsión de la masa de células que forman el ovocito con su cúmulo (OKAMURA y col., 1972). Otro posible mecanismo de acción de las PG sería la liberación de enzimas lisosomiales que digerirían la pared folicular (TOZZINI y PINEDA, 1988).

La descarga de FSH, que acompaña a la de LH en los ciclos naturales, parece que interviene en las siguientes misiones: A) Estimula la producción del activador del Plasminógeno para que convierta al Plasminógeno en la enzima proteolítica activa, la Plasmina, que interviene en la desintegración de la pared del folículo (STICKLAND y BEERS, 1976). B) Estimula el depósito de Acido Hialurónico en el cúmulo del ovocito lo que permite a éste quedar flotando en el líquido folicular momentos antes de su ruptura. Se ha visto " in vitro" que esta acción es dependiente de la acción de FSH (EPPIG, 1979). C) Asegura, como se vió anteriormente, un

nivel adecuado de receptores de LH en la capa de células de la granulosa.

En resumen podemos decir, junto con HODGEN (1989), que los mecanismos para que se produzca la expulsión del ovocito son los siguientes:

1.- Proteolíticos : Se produce un gran incremento en la concentración del Activador de Plasminógeno en el momento preovulatorio.

2.- Mucificación : Antes de que suceda la rotura del folículo el complejo Cúmulo-Corona-Ovocito se separa de la pared folicular acumulándose en él glicosaminoglicanos.

3.- Musculares : Se conoce la existencia de músculos de fibra lisa en los folículos y parece evidente su papel en la expulsión del ovocito.

4.- Angiogénicos : Recientemente se han encontrado en el LF factores angiogénicos, que pueden también ayudar a la rotura folicular, aunque éstos factores, necesitan mayor investigación.

IV.1.2.3.- FASE LUTEA :

Las células de la granulosa aumentan de tamaño adoptando un característico aspecto vacuolado. Además los capilares penetran en ella alcanzando la cavidad

central fácilmente y rellenándola de sangre, desembocando todos estos cambios en la formación del cuerpo lúteo. El 8º ó 9º días postovulatorios se alcanza el punto máximo de vascularización del cuerpo lúteo que coincide con el nivel máximo de Progesterona y E_2 en sangre periférica durante la fase lútea.

Estudios en mujeres han demostrado que el cuerpo lúteo segrega Progesterona de una manera pulsátil. Estos pulsos son más frecuentes al principio y en la mitad de la fase lútea, cuando la secreción de Progesterona es máxima. Este modelo parece adecuado en base a que la Progesterona es dependiente de LH y está se segrega de manera pulsátil. Muchas evaluaciones de la fase lútea con solo una o pocas determinaciones en los niveles de esta hormona nos llevan a engañosas interpretaciones sobre este enfoque (HODGEN,1989).

La función lútea normal requiere un desarrollo folicular preovulatorio óptimo. Pruebas experimentales apoyan este concepto ya que la acumulación de receptores de LH durante la fase folicular predetermina la extensión de la luteinización y la subsiguiente capacidad funcional del cuerpo lúteo (STOUFFER y HODGEN, 1980).

Es fundamental que la capa de células de la granulosa se vascularice adecuadamente para asegurar el

transporte del Colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDL), que son el substrato necesario para la producción hormonal del cuerpo lùteo (CARR y col., 1982). La función normal de éste requiere la presencia continua de pequeñas cantidades de LH (MOUDGAL y col., 1972). Así las pacientes a las que se realiza una estimulación ovárica trás hipofisectomía médica previa suelen necesitar dosis suplementarias de hCG en la fase lútea (HEDON y col., 1988).

De ordinario los niveles de Progesterona alcanzan a los 8 días de la descarga de LH su valor máximo. La Progesterona actua tanto a nivel local como general (como se vió anteriormente pag. 17) inhibiendo la iniciación de nuevo crecimiento folicular (DiZEREGA y HODGEN, 1982)

La fase lútea tiene un periodo de tiempo fijo de aproximadamente 14 días. No es posible prolongar esta fase indefinidamente, aunque se administre LH; lo que hace pensar que la muerte del cuerpo luteo se debe a un efecto luteolítico activo, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que el cuerpo lúteo degenera (NISWANDER y NETT, 1988). estando involucrado en este proceso la $PGF_{2\alpha}$ (AULETA y col., 1978) y el E_2 (KARSCH y SUTTON, 1976).

IV.1.3.- PEPTIDOS OVARICOS :

Se sabe que existe una serie de sustancias en el ovario, denominadas **péptidos ováricos o reguladores intraováricos**, que juegan, junto con los esteroides, un papel paracrino y autocrino, sin duda esencial en los fenómenos de crecimiento y selección de los folículos (CHARBONNEL, 1987). Quizás la teoría estrogénica de la dominancia deberá ser reafirmada o profundamente modificada cuando el conocimiento de la regulación y la interacción de estas sustancias sean mejor conocidos (TSAFRIRI, 1988).

Los reguladores intraováricos encontrados en la especie humana que no se han identificado con otras hormonas conocidas según TSAFRIRI (1988) son : Proteína reguladora folicular, Inhibidor de la unión de FSH a sus receptores, Inhibidor de la unión de la LH a sus receptores, Inhibidor de la luteinización, Estimulador de la luteinización, e Inhibidor de la maduración del ovocito.

Existen otros muchas substancias paracrinas o autocrinas reguladoras de la función ovárica (TSAFRIRI, 1988). El papel exacto de estos reguladores no se puede aún precisar, pero las interacciones locales esteroideas y de estas sustancias hacen que los diferentes folículos no respondan de una manera uniforme; así tanto la

dominancia folicular para unos folículos como la atresia para otros, tienen el mismo macroambiente hormonal de las gonadotrofinas. La FSH en particular parece ejercer una parte importante de sus acciones estimuladoras haciendo que las células de la granulosa segregen estos péptidos reguladores (CHARBONNEL, 1987).

IV.2. - ESTIMULACION OVARICA :

El objetivo principal en el ciclo estimulado es conseguir el mayor número posible de ovocitos maduros, con capacidad de desarrollo y con un crecimiento lo más sincrónico posible. En principio se necesitan unos niveles de FSH elevados durante la fase folicular temprana para conseguir un número máximo de folículos competentes y sincrónicos, pero sin llegar a producir una hiperestimulación ovárica tras la administración de hCG. Esta etapa tiene una gran importancia en los programas FIV-TE (JONES y col., 1983). Existe un periodo de tiempo para poder realizar este proceso, que se denomina ventana de FSH (KERIN y WARNES, 1986). Su duración aproximada es de 4 a 5 días. Posteriormente no es posible reclutar folículos competentes ya que como vimos anteriormente (pag. 27) la retroalimentación negativa de los estrógenos inducirá una disminución de los niveles de FSH condenando a la atresia a todos los

folículos no seleccionados de este ciclo. Pero si se amplía esta ventana, se consigue un reclutamiento de muchos foliculos en diferentes etapas de su desarrollo, produciendo un grado intolerable de asincronía entre ellos. (KERIN y WARNES, 1986).

La duración de la estimulación ovárica también tiene una gran importancia para obtener un ciclo óptimo. Aunque es difícil de precisar con exactitud su longitud, debe durar entre 9 y 15 días, las estimulaciones demasiado cortas, dan lugar a ovocitos inmaduros; mientras que con las estimulaciones demasiado largas, se obtienen ovocitos inmaduros y postmaduros (HODGEN, 1986). Este asincronismo de reclutamiento y de maduración que se produce es muy difícil de conocer por los controles que se realizan durante el ciclo, dando lugar a malos resultados (CHARBONNEL, 1987).

La ovulación múltiple, después de la administración de gonadotrofinas, no es sólo el resultado de aumentar la disponibilidad de las gonadotrofinas en sí, sino que también se debe a un efecto indirecto al superar los mecanismos de la primera etapa de la selección folicular (GOODMAN y HODGEN, 1983). Si se aplica la hipótesis anterior al término de "trayectoria folicular" de SCHWARTZ, se puede decir que las gonadotrofinas serían los impulsos, y los factores ováricos la "guía" a lo

largo de la trayectoria, en forma similar a un proyectil lanzado desde la superficie (HODGEN, 1986). Se necesita un impulso continuo, para que la trayectoria no sea limitada, y por supuesto un impulso excesivo dañaría la exactitud y la precisión de este desarrollo (HODGEN, 1986).

Un problema con que se enfrentan los centros de FIV-TE es la necesidad de identificar el mejor protocolo que conduzca al desarrollo de folículos múltiples con ovocitos maduros a partir de los cuales se obtengan embriones que se desarrollen bien sin que está estimulación afecte de forma adversa al endometrio y disminuya la tasa de embarazos clínicos.

La mayoría de los grupos que realizan programas de FIV-TE utilizan ciclos estimulados, aunque existen algunos que emplean el ciclo natural (DUBUISSON y col., 1989; LENTON y col., 1989).

IV.2.1.- ESTIMULACION CON CITRATO DE CLOMIFENO:

La administración de Citrato de Clomifeno (CC) al principio del ciclo menstrual produce una elevación transitoria de FSH en plasma, permitiendo el rescate de folículos de la atresia, por los mecanismos que anteriormente se han mencionado.

Existen discrepancias en la dosis de CC a utilizar en los protocolos de estimulación ovárica (LOPATA y col., 1983; QUIGLEY y col., 1983), ya que las propiedades antiestrogénicas del CC pueden tener efectos adversos sobre el folículo produciendo alteraciones en los ovocitos y cuerpos lúteos inadecuados que alteren el endometrio. LAUFER y col. (1983) observan en estudios "in vitro" e "in vivo" realizados en animales un efecto deletereo del CC sobre la maduración de ovocitos y embriones de ratas; por ello aconsejan emplear la menor dosis eficaz.

Para conocer el momento más apropiado para iniciar la administración del CC, MARRS y col. (1983) realizan un estudio en el que concluyen que el 5º día del ciclo menstrual es el día óptimo para iniciar la estimulación ovárica. Posteriomente se ha comprobado que el momento apropiado para iniciar la estimulación ovárica depende de la longitud del ciclo (LOPATA y col., 1983).

En la actualidad se emplea el CC combinado con Gonadotrofina Menopáusica Humana (hMG), ya que el número de ovocitos que se obtienen en los protocolos de estimulación ovárica que utilizan sólamente CC es pequeño y el índice de gestaciones depende del número de embriones transferidos (JONES, 1986; CLAMAN y col., 1987).

IV.2.2.- ESTIMULACION CC/hMG/hCG :

LOPATA y col. (1983) al comparar un protocolo de estimulación con CC solo, con otro en que se combinan CC y hMG con dos brazos: el primero a dosis fija y el segundo en régimen individualizado, obtienen una tasa mayor de ovocitos en los regímenes de combinación aunque el índice de fertilización fue mayor con CC sólo. El índice de gestaciones fue mayor en el grupo de pacientes que se incluyeron en el protocolo de combinación CC + hMG de manera individualizada.

También otros autores obtienen más gestaciones con un protocolo de CC + hMG pero individualizándolo con dosis bajas de CC (QUIGLEY y col., 1985). Hay grupos que incluso individualizan más la dosis y el tiempo de administración, incluyendo en su protocolo el mayor número de variables posible, de acuerdo con las necesidades individuales de las pacientes. Ajustando la dosis de CC al peso de la paciente y la duración de sus ciclos menstruales (TAYMOR y col., 1984).

VARGYAS y col. (1984) comparan dos protocolos de CC/hMG/hCG. En el primero se administra en régimen secuencial, 150 mg de CC del 3º al 7º del ciclo seguidos de 2 ampolla de hMG / día, de 3 a 5 días. El otro es un protocolo combinado en el que además de la dosis de CC

se administraron dos ampollas de hMG los días 3º, 5º y 7º del ciclo continuando con la misma dosis hasta que se logró que dos folículos alcanzaran un diámetro mayor o igual a 18 mm. Aunque los grupos no son muy numerosos se obtuvo una tasa mayor de gestaciones con el regimen secuencial.

La tasa de gestaciones en los programas de FIV-TE, parece no modificarse por las variaciones en la dosis y duración de la administración de CC y hMG en un protocolo combinado (HILL y col., 1987).

Cuando se emplea CC en los ciclos de estimulación ovárica se deben tener en cuenta, de acuerdo con la bibliografía, los siguientes puntos (YEE y VARGYAS, 1986) :

A) Utilizar CC + hMG.

B) Utilizar la dosis de CC más baja posible.

C) Ajustar la dosis, el momento de administraciòn y su duración de manera individualizada.

IV.2.3.- ESTIMULACION CON GONADOTROFINAS :

Es fundamental que la estimulación ovárica con gonadotrofinas comience en los 4 ó 5 primeros días del

ciclo, para reclutar y seleccionar un número suficiente de folículos maduros antes de la fase de dominancia. Teóricamente es importante dar una dosis alta de gonadotrofinas en los días citados; sobre todo de FSH. En todos los protocolos con gonadotrofinas su dosis es mayor en los días 3 - 4, reduciéndose después de manera progresiva durante el resto de la fase folicular. No obstante la iniciación de la administración de la hMG en los días 1º a 3º del ciclo no parece alterar el índice de embarazos (DLUGI y col., 1985).

Se describen a continuación diversos protocolos de estimulación con gonadotrofinas.

IV.2.3.1.- hMG/hCG :

Con este protocolo se han observado resultados diferentes según el modelo de respuesta estrogénica hallado después de la administración de hCG, obteniendo las mejores tasas de gestaciones en pacientes con un aumento regular y continuo de E_2 (ROSENWAKS y MUASHER, 1986).

Si se comparan los resultados de los protocolos de estimulación ovárica CC/hMG/hCG con hMG/hCG se observa, que el mejor desarrollo folicular y la mayor tasa de

fertilización se consiguen con el régimen de CC/hMG/hCG (VARGYAS y col., 1984; DIAMOND y col., 1986).

IV.2.3.2.- FSH/hMG/hCG :

Para tratar de mejorar los pobres resultados que se obtenían con el protocolo de hMG/hCG en pacientes con baja respuesta estrogénica, se aumentó la dosis de gonadotrofinas en los días 3º y 4º, agregando 2 ampollas de FSH pura a la dosis correspondiente de hMG. Se mejoraron el número de ovocitos recogidos y de embriones transferidos, así como la tasa de gestaciones (BERNARDUS y col., 1985). Se observó que los niveles de E_2 se elevaban ligeramente cuando se comparaban con los del protocolo de hMG/hCG.

Se han probado varios regímenes de estimulación de la ovulación para programas de FIV - TE, variando la dosis y la duración de la administración de FSH, encontrando que el régimen que más alta tasa de gestaciones consigue es el denominado Combo I, que consiste en administrar 2 amp./ día de hMG desde el 3º día del ciclo asociadas con 2 amp. de FSH los día 3º y 4º del ciclo (NAVOT y ROSENWAKS, 1988).

IV.2.3.3.- FSH/hCG

Con pacientes que seguían respondiendo mal a los anteriores protocolos se intentó mejorar los resultados administrando únicamente, dada la experiencia que se tenía en monas (SCHENKEN y col., 1984), 4 ampollas de FSH el 3º y 4º días del ciclo continuando con 2 ampollas los días restantes. El criterio para la administración de hCG fue semejante al de los protocolos anteriores. Aunque no se hallaron diferencias significativas en cuanto al número de ovocitos preovulatorios obtenidos al comparar sus resultados con los de anteriores protocolos, se observó una tendencia a ser mayor el número de ovocitos en las pacientes a las que se administraba FSH únicamente (JONES y col., 1985).

IV.2.4.- ANALOGOS DE LA Gn-RH :

La administración prolongada de un agonista de Gn-RH puede inhibir la secreción endógena de gonadotropinas creando una situación de hipofisectomía médica reversible. Teóricamente la administración de un análogo en los programas de FIV-TE presenta los siguientes beneficios (CHARBONNEL, 1987):

a) Bloqueo de la descarga endógena de LH.

b) Obtención de un número mayor de folículos.

c) Mejora la respuesta a la estimulación en pacientes con "malas respuestas".

La administración del análogo puede realizarse de dos maneras dependiendo del día del ciclo en que se encuentre la paciente: Protocolo largo: el día 22º del ciclo se comienza la administración del análogo y después de la hipofisectomía médica se continua administrando junto con las gonadotrofinas. Protocolo corto: El 2º día del ciclo se comienza la administración conjunta del análogo y las gonadotrofinas simultaneamente.

HEDON (1988) observa un aumento significativo del número de ovocitos recogidos, mayor número de embriones, aumento de la tasa de implantación de estos embriones y por consiguiente mayor tasa de gestaciones cuando estimula con análogos de la Gn-RH y gonadotrofinas, con el protocolo largo. Estos resultados son más significativos que los del protocolo corto en pacientes que acuden al programa FIV-TE por factor tubárico o por endometriosis; cuando las pacientes padecen una esterilidad sin causa aparente o por factor masculino las diferencias de los resultados son muy pequeñas.

Recientemente se ha publicado un estudio en el que se compara un protocolo de estimulación ovárica con

Gn-RH/hMG y otro con CC/hMG concluyendo que se obtiene un número igual de gestaciones en ambos. Sin embargo las tasas de cancelaciones de tratamiento y de gestaciones por transferencia eran más altas con el protocolo de CC/hMG (DE ZIEGLER y col., 1989). Los autores confirman que el protocolo de CC/hMG es aún válido sobre todo en las pacientes menos propensas a luteinización prematura de sus folículos.

IV.2.5.- OTROS PROTOCOLOS :

También se ha utilizado hormona del crecimiento asociada al CC/hMG, aunque aún es pronto para valorar sus resultados, como protocolo de estimulación ovárica en pacientes sometidas a una FIV-TE (OWEN y col., 1989; BLUMENFELD y col., 1989; GENAZZANI y col., 1989).

IV.2.6.- CONTROL DE LA RESPUESTA OVARICA :

Los objetivos del control de la estimulación ovárica son: a) verificar la respuesta de los ovarios a nivel de desarrollo folicular y endocrino; b) determinar lo más pronto posible, si existe, el inicio de descarga endógena de LH; c) determinar el momento idóneo en que se debe administrar hCG para desencadenar

la ovulación y proceder a la punción folicular antes de que esta se produzca.

El crecimiento folicular, en los ciclos naturales, evaluado día a día por ecografía evoluciona de forma casi lineal durante 5 días anteriores a la ovulación y se correlaciona bien con la elevación preovulatoria de E_2 en sangre (KERIN y col., 1981). Sin embargo ni las mediciones del diámetro folicular ni los niveles de E_2 por sí solos se consideran suficientemente precisos para determinar el momento idóneo de administración de la dosis de hCG, antes de que se inicie el incremento endogeno de la LH. Esta falta de precisión es más grande en los ciclos estimulados por la mayor o menor asincronía que se produce en la cohorte de folículos, ya que son diferentes sus tamaños así como las cantidades de E_2 que proporcionan cada uno de ellos.

En los regímenes de CC o CC + hMG se han obtenido buenos resultados en la vigilancia del crecimiento folicular mediante control ecográfico y los niveles de E_2, pero al ir acercándose el folículo a la madurez es necesario vigilar los niveles de LH, para detectar la oleada ovulatoria de LH (KERIN, 1983).

También se puede llevar a cabo la vigilancia mediante la determinación de Progesterona durante el

periodo preovulatorio. Cuando las concentraciones basales de LH son altas pero no se sabe si se ha producido la oleada endógena de LH, la existencia de un aumento significativo de Progesterona en plasma, acompañado de una meseta o descenso de E_2 indica que ya se ha producido la oleada de LH (KERIN y col., 1985).

Por último, también se ha utilizado como control de estimulación ovárica la valoración de los cambios endometriales junto con las mediciones del diámetro folicular (SMITH y col., 1984).

V.- PUNCION FOLICULAR

Las primeras tentativas de recogida ovocitaria con intención de FIV-TE fueron realizadas por EDWARDS y col. en 1966 practicando laparotomía para la punción folicular. Posteriormente STEPTOE y EDWARDS (1970) describieron la técnica de punción folicular por laparoscopia. Este método fue utilizado en exclusividad hasta 1982 en que aparecieron los primeros trabajos de recogida transabdominal guiando la aguja de punción folicular por ecografía.

V.1.- LAPAROSCOPIA:

La laparoscopia se lleva a cabo en la forma habitual, pero es preciso tener en cuenta que cualquier medicación que la paciente inhale o reciba por vía sistémica alcanzará al folículo en cuestión de segundos. Desgraciadamente, todavía, la información sobre la toxicidad de diversos agentes sobre el ovocito es casi inexistente (ACOSTA, 1988).

El pH folicular puede ser alterado por el CO_2 con el que se suele realizar el neumoperitoneo (FEICHTINGER y col., 1983), aunque no todos los autores están de acuerdo con ello. Para otros la posible alteracion del pH del líquido folicular producida por el CO_2 usado en el neumoperitoneo no altera la tasa de gestaciones en los programas de FIV-TE (ACOSTA y col., 1986).

No existe acuerdo generalizado sobre el grado en que afecta la anestesia a la tasa de éxitos de un programa de FIV-TE. Algunos autores encuentran efectos negativos (BOYERS y col., 1987a; HAYER y col., 1987), mientras que otros no detectan ninguna influencia (SHENHAV y col., 1989). Asi ovocitos recogidos del fondo de saco de Douglas, que han estado en contacto con líquido peritoneal, sangre y 100% de CO_2 presentan una

tasa de fertilización y división similar a ovocitos recogidos de los folículos (DIRNFELD y col., 1989).

Recientemente se ha demostrado que el lavado de los folículos, después de aspirar el líquido folicular, puede dar lugar a reacciones alérgicas tardías si el medio de cultivo lleva proteínas heterólogas a la paciente no habiendose estudiado el posible efecto perjudicial de estas reacciones sobre la tasa de gestaciones (MORALES y col., 1988).

V.2.- ECOGRAFIA :

LENZ y col. (1981) describieron la técnica de punción folicular guiando la aguja con ultrasonidos por vía transvesical. La punción ecográfica presenta sobre la laparoscópica la ventaja de resolver el problema de las adherencias pélvicas, no emplear anestesia general y tener menos complicaciones. Es, por tanto, fácilmente repetible.

Existen tres vías para llevar a cabo la punción folicular bajo visión ecográfica: transvesical (FEICHTINGER y KEMETER, 1984), transuretral (PARSONS y col., 1985) y vaginal (GLEICHER y col., 1983; DELLENBACH y col., 1984); utilizando la mayoría de los grupos en la

actualidad la vía vaginal (COHEN y col., 1986; SEIFER y col., 1988).

V.3.- LAPAROTOMIA

EDWARDS y col. en 1966 utilizó la laparotomía para la recogida de ovocitos, cayendo posteriormente este método en desuso. Diferentes estudios demuestran que la tasa de gestaciones en los programas FIV-TE, cuando se utiliza la laparotomía para la obtención de ovocitos, al mismo tiempo que se realiza cirugía pélvica, es similar a la que se obtiene al utilizar la laparoscopia como medio de recogida de ovocitos (MASTROIANNI y col., 1983; ROH y col., 1988; TUREK y col., 1988), aunque este método solo debe ser usado en circustancias muy especiales.

VI.- LABORATORIO DE FERTILIZACION "IN VITRO"

VI.1.- IDENTIFICACION Y CLASIFICACION DE LOS OVOCITOS

Tras la punción folicular es necesario realizar una valoración lo más precisa y al mismo tiempo lo más rapida posible de la madurez del ovocito. En la actualidad esta problemática valoración sólo se lleva a cabo

mediante el estudio de la morfología del ovocito, puesto que no hay acreditada ninguna prueba bioquímica, hormonal o inmunológica del líquido folicular (LF) que permita estimar la madurez del ovocito (ver sección IX pag. 85).

La evaluación directa al microscopio de la morfología del ovocito ha llegado a ser el parámetro más utilizado para valorar la madurez ovocitaria (VEECK, 1986d). Se han publicado en la literatura varias clasificaciones sobre la madurez de los ovocitos recogidos después de la estimulación ovárica en los programas de FIV-TE:

- J. TESTART, 1983
- L. VEECK, 1983
- A. MARRS, 1984

Para clasificar los gametos femeninos hay que valorar los siguientes parámetros en cada ovocito:

A: Estadio del núcleo: vesícula germinal, corpúsculo polar,...

B: Características del citoplasma.

C: Apariencia de la Corona radiada: (densa capa de células de la granulosa en íntimo contacto con el ovocito).

D: **Grado de expansión de la masa del Cúmulo**: que comprende el material mucoide y las células que rodean al Cúmulo.

E: **Aspecto de las células de la granulosa** presentes en el LF (detritus).

VI.1.1 CLASIFICACION DE L. VEECK :

La clasificación más didáctica es la descrita por Lucinda VEECK y col. (1983) que separa a los ovocitos en varios grupos según los parámetros anteriormente referidos:

OVOCITO MADURO O PREOVULATORIO (METAFASE II):

El ovocito en metafase II se caracteriza por la expulsión del primer corpúsculo polar (CP), esta estructura es la primera indicación de que el proceso de maduración se ha completado. El CP I sirve como depósito del material cromosómico extra que es expulsado del ovocito después de la telofase de la primera división meiótica.

La morfología típica del ovocito preovulatorio bajo la visión microscópica presenta las siguientes características:

A.- Expulsión del CP I.

B.- El citoplasma es redondo y plano, claro en su interior y homogéneo en sus granulaciones.

C.- Corona Radiada expandida y radiante.

D.- Las células del Cúmulo estan presentes en una delgada masa de mucopolisacáridos (esta masa expandida es visible macroscópicamente).

E.- Las células de la granulosa que acompañan al ovocito en el LF son abundantes y grandes presentandose en agregados laminares sueltos.

OVOCITO POSTMADURO :

Los ovocitos postmaduros se producen por la luteinización endógena espontánea y no aspiración en el momento adecuado. Estos ovocitos también se observan en los casos de estimulación de la ovulación cuando se demora la administración de la hCG y no se produce el pico de LH endógeno (VEECK, 1986b).

Al microscopio los ovocitos postmaduros o viejos aparecen con las siguientes características:

A.- CP intacto o fragmentado.

B.- El citoplasma puede ser ligeramente obscuro y granular, pudiendose observar vacuolizaciones.

C.- La Corona Radiada puede estar extremadamente expandida o completamente reducida. Las células son generalmente obscuras.

D.- La masa del Cúmulo esta ausente obscura.

E.- Las células de la granulosa son obscuras y maduras.

OVOCITOS INTERMEDIOS (METAFASE I) :

Los ovocitos en metafase I se caracterizan por la ausencia tanto del primer CP como de la vesícula germinal. Este tipo de ovocitos son aptos para completar su madurez después de su recogida "in vitro". Como la expulsión del primer CP puede ocurrir en cualquier momento es necesario examinarlos a intérvalos regulares para determinar el momento en que madura su núcleo expulsando el primer CP. Si el ovocito en metafase I necesita menos de 15 horas de cultivo para su maduración se denomina Ovocito en metafase I maduro, si necesita más de 15 horas para expulsar el CP se le llama Ovocito en metafase I inmaduro.

La imagen típica microscópica de este ovocito tiene las características siguientes:

A.- No se observa ni CP ni vesícula germinal (VG).

B.- Citoplasma plano, redondo y generalmente claro aunque a veces ligeramente granular.

C.- Corona Radiada ligeramente expandida.

D.- La masa del Cúmulo puede estar expandida o ser densa.

E.- Las células de la granulosa presentan características de madurez.

OVOCITO INMADURO (PROFASE I: ESTADIO DE VESICULA GERMINAL):

El ovocito en estadio de profase I se caracteriza por la presencia de una VG intacta. La VG que ha persistido a lo largo de las primeras fases del crecimiento del ovocito, ahora empieza su progresión hasta su desaparición. Esto puede ocurrir al poco tiempo de haber recogido el ovocito o en unas horas, dependiendo este tiempo de su grado de madurez antes de la aspiración.

Los núcleos o VG de los ovocitos humanos son más o menos esféricos y usualmente contienen un sólo nucleolo excéntrico. La VG suele estar colocada en el citoplasma centralmente en los ovocitos muy inmaduros y más excéntricamente posteriormente antes de su desaparición. El material cromosómico en la VG es tetraploide respecto a la cantidad de DNA. La disolución de la VG es la primera indicación práctica de que la meiosis ha sido reanudada.

La imagen microscópica típica del ovocito en profase I muestra las siguientes características:

A.- VG intacta esférica y con un sólo nucleolo.

B.- Citoplasma regular o irregular que muestra algún grado de granulaciones y obscurecimiento en el centro.

C.- Corona Radiada compacta y no expandida.

D.- Ausencia de expansión del Cúmulo.

E.- Células de la granulosa pequeñas y en grupos pequeños y compactos.

OVOCITOS DEGENERADOS O ATRESICOS (NO VIABLES):

Ovocitos degenerados pueden existir en cualquiera de los estadíos nucleares descritos previamente. La degeneración o atresia puede ocurrir en un ovocito en cualquiera momento de su proceso de maduración dentro del folículo, desde estadíos de inmadurez precoz a la postmadurez.

La degeneración produce múltiples aspectos morfológicos anormales dentro del aspirado folicular desde obscurecimiento y formación de vacuolas en el citoplasma a fragilidad de las estructuras de soporte, especialmente de la zona pelúcida. Quizas la degeneración o atresia ovocitaria es fácil de identificar porque presenta un aspecto sorprendentemente anormal. Podemos decir, pués,

que las características de este ovocito son:

A.- Estadio nuclear en cualquier etapa de maduración.

B.- Citoplasma irregular y obscuro en ocasiones.

C.- Escasas células en la Corona radiada.

D.- Probablemente no presenta Cúmulo.

E.- Asociado a células de la granulosa escasas, pequeñas y no viables.

Este tipo de ovocitos no deben inseminarse porque evidentemente no son gametos viables. Dentro de este grupo se puede distinguir un subgrupo propio ovocitos con zona fracturada cuya morfología microscópica típica es la siguiente:

A.- Estadio nuclear desconocido, por el daño del citoplasma.

B.- Citoplasma de color marrón obscuro o negro sin estar contenido en la membranas.

C.- Las células de la Corona son radianes, semejantes a las de los ovocitos maduros.

D.- Células del Cúmulo con las características de madurez.

E.- Células de la granulosa con aspecto de madurez.

F.- Rotura y separación de la zona pelúcida.

VI.1.2. CLASIFICACION DE J. TESTART

La clasificación de TESTART y col. (1983), es más simple, divide a los ovocitos en varios grupos:

- **Maduros (+++)** : Cúmulo muy expandido de apariencia suelta, Corona Radiada clara y dispersa y ovocito reconocible.
- **Intermedios (++)** : Cúmulo expandido pero con apariencia óptica densa con Corona adherida al ovocito.
- **Inmaduros (+)** : Cúmulo muy compacto, ópticamente muy denso y de apariencia obscura con Corona muy adherida al ovocito.
- **Vesícula germinal (0).**
- **Pelúcida rota** : Se han roto el ovocito y sus cubiertas.

VI.1.3.- CLASIFICACION DE R. MARRS

MARRS y col. (1984) dividen a los ovocitos en cuatro apartados:

Grado 0 : No se evidencian el Cúmulo, la Corona ni el primer corpúsculo polar. La VG puede estar presente o ausente.

Grado 1 : Escaso y grueso Cúmulo y Corona rodean a la zona pelúcida. No se observa VG.

Grado 2 : Cúmulo de tamaño moderado con células dispersas.

Grado 3 : Cúmulo grande y bien expandido con delgada demarcación de la Corona.

VI.2.- PREPARACION DEL SEMEN :

Los gametos masculinos, para ser utilizados en fertilización in vitro, necesitan una preparación que supla los procesos de capacitación que sufren naturalmente en el tracto genital femenino (CHANG, 1951; AUSTIN, 1951).

Con las técnicas que se utilizan para capacitar artificialmente a los espermatozoides, se obtiene también una mejoría de su calidad, ya que se libera de detritus, de células muertas, aglutinaciones, etc., seleccionando al mismo tiempo los espermatozoides de mejor movilidad (ACOSTA, 1988).

Existen diversas técnicas para la preparación del semen en los programas de FIV-TE, relacionadas con la calidad del semen. Entre las más usadas se encuentran:

- Swim-up (DEVRIUS, 1971)
- Gradiente de Albúmina (ERICSON, 1973)
- Gradiente de Percoll (FOSTER y col., 1983)
- Migración espermática (LOPATA y col., 1976)

Siempre que el semen que se utilice presente unos parámetros normales, la mayoría de los grupos están de acuerdo en utilizar la técnica de "Swim-up" (DREVIUS, 1971). Con esta técnica se tiene, en los programas de FIV-TE, amplia experiencia habiéndose obtenido buenos resultados en las condiciones anteriormente señaladas (MARRS y col., 1986; McDOWELL, 1986).

Existen diferencias de unos grupos a otros en cuanto al medio de cultivo, el tiempo y la velocidad de centrifugado que utilizan: hay quién utiliza como medio el Ham-F-10 a una dilución de 1/3; centrifugando a 400 g durante 10 minutos (ASCH y col., 1984). Otros utilizan Tyrode como medio de cultivo; la dilución con el semen es 1/6, centrifugando a 300 g durante 5 minutos (TESTART y FRYDMAN, 1982). Estas variaciones no afectan a los resultados de las programas de FIV-TE.

Cuando los parámetros del semen están por debajo de la normalidad, al mismo tiempo que se capacita al semen se debe seleccionar el mayor número posible de espermatozoides móviles. Para tratar de conseguir esta meta se comienza modificando el método de recogida de semen, utilizando la eyaculación fraccionada y la eyaculación directamente sobre medio de cultivo.

Con la capacitación de semenes anormales mediante el método de "Swim-up" se obtienen pobres resultados (COHEN y col., 1985; TANPHAICHITR y col., 1987), por ello se han utilizado los otros métodos mencionados anteriormente.

El sistema de Gradiente de Albúmina, utilizado en el programa de FIV-TE de Clamart, mejora la movilidad de los espermatozoides (PERRONE y TESTART, 1985).

Con el Gradiente de Percoll al igual que con la anterior técnica se obtiene un alto porcentaje de espermatozoides móviles, pero esta técnica tiene un grave inconveniente que es la dramática caída del número de espermatozoides. HYNE y col. (1986) consiguieron 3 embarazos en 5 pacientes utilizando esta técnica, después de no haber conseguido éxitos con la técnica de "Swim-up" en las mismas parejas.

Método de Migración Espermática descrito por LOPATA y col. (1976) y modificado, posteriormente, por COHEN y col. (1985).

VI.3.- INSEMINACION :

Concluído el período de incubación del ovocito, variable según el estadío madurativo en que haya sido captado, (en los ovocitos maduros a las 5 horas de la punción), se procede a añadir, al medio de cultivo donde se encuentran los ovocitos, los espermatozoides móviles mediante una micropipeta. HARRISON y col. (1988) estudian la tasa de fertilización de los ovocitos relacionándola con el tiempo transcurrido desde la recogida encontrando que es igual en un rango de 3 a 16 horas. Tampoco encuentran diferencias en las tasas de gestaciones.

La cantidad de espermatozoides preparados y móviles que se ha utilizado para la inseminación ha ido disminuyendo, así METTLER y col. (1982) utilizaban 1 x 10^6/ml, mientras que en 1985 sólo aportan al ovocito 1 x 10^5/ml. Otros autores utilizan incluso un número menor de espermatozoides, de 1 x 10^4 a 5 x 10^4/ml (TROUNSON, 1983). Nuestro grupo utiliza 5 x 10^4 a 1 x 10^5/ml (MOLINA y col., 1988c).

EDWARDS y col. (1984) y BATTIN y col. (1984) han observado que cuando el paciente presenta una oligozoospermia la tasa de fertilización es menor. Para tratar de compensar esta disminución del potencial de fertilidad en estos pacientes, se aumenta el número de espermatozoides móviles que se aportan al ovocito, de 2×10^4/ml que utilizan con sémenes normales, a $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$/ml en eyaculados oligozoospérmicos (BYRD y col., 1984).

Cuando el número de espermatozoides móviles que se ha conseguido es tan reducido que ni siquiera se puede inseminar a todos los ovocitos, una vez que se han concentrado los espermatozoides, es factible realizar los siguientes procedimientos para aumentar la exposición del ovocito a los espermatozoides:

A.- Colocar dos o más ovocitos en el mismo tubo de cultivo.

B.- Introducir los ovocitos directamente con los espermatozoides preparados en el medio de cultivo .

C.- Microgotas de medio de cultivo con los espermatozoides preparados (50 - 100 µl). Se coloca sobre una placa de cultivo introduciendo el ovocito en su interior e incubándolo bajo aceite de parafina (EDWARDS y col., 1981).

D.- Eliminación del Cúmulo del ovocito: MAHADEVAN y TROUNSON (1985) publicaron una técnica de eliminación del Cúmulo con la obtención posterior de gestación. Otros autores utilizando esta técnica han mejorado la tasa de fertilización en dos grupos de pacientes, uno con esterilidad de origen immunológico y otro sin causa conocida (LAVY y col., 1988).

En la actualidad se están experimentando diferentes técnicas para mejorar las posibilidades de fecundación de los sémenes de muy baja calidad en los programas de FIV-TE:

A.- Microinyección de los espermatozoides en el espacio perivitelino e incluso dentro del citoplasma del ovocito (GORDON y LAUFER, 1988; METTLER, 1989).

B.- Mejorar la motilidad del semen mediante la adición de medicamentos a los medios de cultivo (RUDAK y col., 1989).

C.- Cambiar la composición de algunas sustancias en el medio de cultivo para que aumente la capacidad de fecundabilidad del semen (MORTIMER y col., 1986).

D.- Utilización de espermatozoides del cuerpo del epidídimo para fertilización en pacientes con obstrucción de deferentes (MAHADEVAN y TROUNSON, 1985).

VI.4.- SIGNOS DE FECUNDACION :

Los pronúcleos masculino y femenino son formados por la cromatina del espermatozoide y del ovocito respectivamente. Ambos pronúcleos son generalmente del mismo tamaño y forma. Aunque a veces puede aparecer uno de ellos de un tamaño algo mayor, presumiblemente el masculino (VEECK y MALONEY, 1986). Varios nucleolos son usualmente observados dentro de las membranas pronucleares. Su localización en el citoplasma puede ser central o hacia la periferia en la célula.

Los dos criterios más prácticos para determinar la penetración del espermatozoide en el material humano vivo son según VEECK, (1986c):

A.- Observación de dos pronúcleos a las 14-20 horas postinseminación.

B.- Visualización de los dos CP en el espacio perivitelino.

La observación de estos dos parámetros es rápida, simple y necesita de una simple mirada. Desgraciadamente, la existencia de dos pronúcleos no es una prueba de normalidad en el proceso de fertilización y tampoco se puede asegurar que uno de los pronúcleos sea paterno y el otro materno (ACOSTA, 1988). La expulsión del segundo CP como medio para determinar la activación del ovocito es así mismo equívoca, con errores potenciales, ya que puede ocurrir sin que se haya producido la penetración. También la división del primer CP puede dar lugar a engaño (VEECK, 1986c).

El examen del ovocito a las 20 horas de la inseminación es importante ya que el concepto puede desarrollarse con una morfología aparentemente normal, aunque presente en estos momentos sólamente uno, tres o más pronúcleos. La tasa de ovocitos poliploides en nuestro programa FIV-TE es del 6,8% (MOLINA y col., 1988d). Fallos en la identificación de zigotos anormales pueden dar lugar a transferencia de conceptos anormales, incrementándose de esta manera la incidencia de abortos espontáneos, puesto que estos embriones no son viables (VEECK, 1986b).

El concepto de Singamia se define como el proceso que sigue al desarrollo pronuclear y el subsiguiente desmoronamiento de los pronucleos y su membrana. El

final del proceso de fertilización implica la reorganización y unión de los distintos cromosomas paternos y maternos. Existe un breve periodo de tiempo en el que el zigoto queda como una sola célula, hasta que realiza su primera división.

VI.5.- PRIMERAS DIVISIONES DEL EMBRION :

Las divisiones del zigoto implican una serie de mitosis, dividiéndose el citoplasma, sin cambios en su tamaño total. Sucesivas divisiones celulares acontecen con un ritmo aproximado de una división cada 12 ó 14 horas. Solo el 82% de los ovocitos fecundados continua su desarrollo dividiéndose (MOLINA y col., 1988d).

Normalmente la división en dos células del concepto es observada algún tiempo después de las 22 horas postinseminación, usualmente a las 24 horas y hasta cerca de las 44 horas postinseminación. El estadío de 4 blastómeras se observa entre las 36 y 50 horas postinseminación; el de 8 células después de las 58 horas y el de 16 células a partir de las 68 horas. Los estadíos de 3, 5 y 7 células son también claramente observados si el examen es llevado a cabo durante la división mitótica celular. La división de las blastómeras del concepto de 2 células es pocas veces sincrónico por lo que el

estadío de 3 células se interpone entre los de 2 y 4 células (VEECK, 1986c).

El desarrollo de estos embriones, expresado por el número de blastómeras que presentan en el momento de la transferencia, es también un parámetro que influye en la tasa de gestaciones (CLAMAN y col., 1987). Sin embargo, no existe acuerdo acerca de si los restos citoplasmáticos que aparecen en algunos embriones interfieren con la tasa de gestaciones, de manera que mientras unos autores creen que dichos restos afectan a la viabilidad de los embriones (DOR y col., 1986) otros opinan que no afectaría (VEECK y MALONEY, 1986; CLAMAN y col., 1987).

VII.- TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia embrionaria es la última, y la menos exitosa, de las etapas en los programas de FIV-TE. Se sabe que la tasa de gestaciones aumenta al transferir un mayor número de embriones (MUASHER y col., 1984; JONES, 1986; CLAMAN y col., 1987). Tampoco existe ningún criterio absoluto para determinar cuando se debe realizar la transferencia embrionaria. Habitualmente se lleva a cabo al segundo día de la punción folicular. Desde la perspectiva de que el desarrollo embrionario es menor "in vitro" que "in vivo", parece lógico realizar la

transferencia lo más pronto posible. No obstante, también se debe tener en cuenta el desarrollo del endometrio, ya que el embrión llega a la cavidad uterina, según el trabajo de CROXATTO y col. (1978), de 48 a 72 horas antes que en un ciclo natural.

Sin tener en cuenta consideraciones teóricas, se han conseguido gestaciones al transferir embriones en diferentes estadios de desarrollo (GARCIA, 1986). Por lo tanto se puede deducir que la receptividad del endometrio o la "ventana de implantación" es más amplia de lo que en un principio se pensaba (GARCIA, 1986). BARRI y col. (1985) publicaron que la tasa de abortos disminuía cuando se transferían embriones en estadíos precoces, a las 24 horas de la punción, sin embargo no se han publicado otros estudios que confirmen esta hipótesis.

La transferencia se lleva a cabo en el quirófano, contiguo al laboratorio de FIV, sin anestesia general, (BELAISCH-ALLART y col., 1984) aunque FISHEL y col. (1987) publican la mejora de la tasa de gestaciones cuando la transferencia se realiza con anestesia general. Sin embargo, este método, no ha sido aceptado debido quizás a los peligros de una anestesia. La administración de indometacina antes de la transferencia enbrionaria no mejora las tasas de exitos (BUVAT y col., 1988b).

LENZ y col. (1987) describieron una técnica de transferencia embrionaria mediante visión ecográfica puncionando el fondo uterino por vía abdominal. Los mismos autores creen que este método sólo debe ser utilizado cuando la vía transcervical no puede realizarse o ésta sea muy traumática. También se han publicado gestaciones transfiriendo los embriones por vías transuretral y transvaginal bajo visión ecográfica (PARSONS y col., 1987).

La concentración de suero inactivado de la paciente en el medio de transferencia es diferente de unos grupos a otros, pero esta diferencia parece irrelevante después del estudio randomizado con una tasa similar de gestaciones independientemente de que se emplearan bajas concentraciones de suero inactivado (20%) o altas concentraciones (90%) (BOYERS y col., 1987b).

También la cantidad de medio en el que se transfieren los embriones al utero juega, para algunos autores, un papel en la tasa de gestaciones ectópicas (SALAT-BAROUX y col., 1985; BELAISCH y FRYDMAN, 1986) mientras que para otros este parámetro no influye en la tasa de ectópicos en los programas de FIV-TE (MARTINEZ y TROUNSON, 1986).

Otra posible modalidad de transferencia embrionaria en la que se transfieran más de 4 embriones, difícil en la actualidad por la posibilidad de congelación embrionaria, ha sido señalada recientemente. Consiste en realizar, en el mismo ciclo, dos transferencias con un intervalo de 24 horas. La tasa de gestaciones aumenta de esta manera (ABRAMOVICI y col., 1988).

VIII.- FASE LUTEA EN CICLOS ESTIMULADOS

Una de las posibles causas de que la tasa de gestaciones en los programas de FIV-TE sean más bajas que las obtenidas en la fertilización natural es la alteración del endometrio durante la fase lútea debido a la estimulación ovárica (COHEN y col., 1984).

Muchos investigadores (KOKKO y col., 1981; COHEN y col., 1984; GARCIA y col., 1984; MARTEL y col., 1987; MARTIKAINEN y col., 1987; THATCHER y col., 1988; MOLINA y col., 1989) entre otros han estudiado la fase lútea después de la estimulación de la ovulación ovárica, pero los resultados de estos estudios son muy discordantes. Una posible explicación a estas discrepacias son los diferentes protocolos de tratamiento en la estimulación ovárica y el momento en que se realiza el estudio de la fase lútea.

Estudios previos realizados en nuestra Unidad demuestran alteraciones en los niveles de E_2 y PRL en sangre periférica y en los receptores citoplásmicos esteroideos endometriales en la fase lútea tras la estimulación ovárica con CC/hMG (MOLINA y col., 1989).

Esta alteración en los niveles periféricos hormonales de la fase lútea en ciclos estimulados también se ha encontrado por otros autores que utilizan un protocolo de estimulación similar al nuestro (COHEN y col., 1984; MARTIKAINEN y col., 1987). Sin embargo hay quienes con la misma pauta de estimulación de la ovulación no encuentran alteración de la fase lútea (PUNNONEN y col., 1988). MARTEL y col. (1987) mediante estudios de microscopía electrónica demuestran marcadas anormalidades ultraestructurales en el endometrio después de estimular la ovulación con CC/hMG/hCG.

Teóricamente esta alteración de la fase lútea puede ser causa de una tasa menor de gestaciones en los programas de FIV-TE. Para tratar de eliminar este problema se ha suplementado la fase lútea de los ciclos estimulados con la administración de hCG o de Progesterona. No obstante, a pesar de que la administración de hCG durante la fase lútea mejora los niveles de Progesterona y su duración, la tasa de gestaciones que se

obtienen no es superior a la de los ciclos sin suplementación (MAHADEVAN y col., 1985; BUVAT y col., 1988a). Sin embargo BLUMENFELD Y NAHHAS, (1988), encuentran un mayor número de gestaciones, incluidos abortos y embarazos bioquímicos, al suplementar la fase lútea con hCG.

Tampoco la suplementación de la fase lútea en ciclos estimulados con Progesterona mejora la tasa de gestaciones (McBAIN y col., 1987; BELAISCH-ALLART y DE MOUZON, 1988). Incluso se han descrito con este tratamiento graves miositis en el lugar de la inyección de Progesterona en alguna paciente (PHIPPS y col., 1988). Otros autores administrando la Progesterona 10 horas antes de la dosis de hCG mejoran estadísticamente la cifra de gestaciones (BEN-NUN y col., 1989). Sin embargo, TROUNSON y col. (1986) administrando Progesterona en el momento de la laparoscopia no mejora sus resultados.

ZDANOVSKY y col. (1989) han observado que el defecto de la fase lútea parece correlacionarse con el volumen del líquido folicular aspirado. El retorno del líquido folicular a la cavidad abdominal inmediatamente después de identificar y extraer el ovocito, ayudaría a resolver estas diferencias puesto que todas las hormonas que se encuentran en el líquido volverían a la paciente. De esta forma obtienen más gestaciones.

Los programas de FIV-TE, como hemos visto, son el único tratamiento para algunas esterilidades tubáricas y también van demostrando su utilidad en otras patologías de la esterilidad humana, además de ser un medio para investigar la fisiología de la Reproducción.

Esta técnica tiene planteadas una serie de problemas, uno de los fundamentales es la valoración de la madurez ovocitaria, su capacidad de fertiliaarse y su potencial desarrollo. La valoración de estos parámetros por la morfología del complejo Cúmulo-Corona-Ovocito no es un análisis concluyente como hemos visto. Por ello vamos a estudiar los trabajos que existen en la literatura sobre la concentración de algunas substancias presentes en el líquido folicular, y la capacidad de predecir la calidad ovocitaria y su potencial desarrollo.

IX.- LIQUIDO FOLICULAR

El crecimiento folicular experimenta una importante transformación en su desarrollo, en la etapa de folículo secundario, pasando de una sólida masa de células que rodean al ovocito a presentar una cavidad central llena de líquido (TOZZINI y PINEDA, 1988).

Inicialmente aparecen entre las células de la granulosa que se están dividiendo, pequeñas áreas de líquido que posteriormente llegan a confluir dando lugar a una cavidad rellena de líquido. Esta configuración folicular es característica de muchos, pero no de todos los mamíferos (GREENWALD y TERRANOVA, 1988). El ovocito rodeado por la Corona Radiada y el Cúmulo se sitúa en una porción excéntrica en la cavidad.

La composición del líquido Folicular (LF) cambia al ir madurando el folículo y al aumentar la cavidad folicular. Los folículos antrales jóvenes contienen un primer líquido en gran parte compuesto por proteoglicanos. Estos proteoglicanos llegan a diluirse por una gradual llegada de líquido procedente del plasma siendo además enriquecido el LF por los esteroides y las pequeñas cantidades de proteínas que se sintetizan en el folículo por la teca interna y las células de la granulosa (LIPNER, 1988).

IX.1.- CARACTERISTICAS GENERALES :

IX.1.1.- CARACTERISTICAS FISICO - QUIMICAS :

Las características físicas del LF en los folículos preovulatorios son muy similares a las del plasma. Su

color es amarillento pálido. Tiene una viscosidad variable y un contenido en electrolitos similar al del plasma (SHALCI y col., 1973).

La concentración de electrolitos en LF : Na^+, K^+, Cl^- y Ca^{++}, medidos por métodos convencionales es similar a los niveles del plasma, aunque el calcio parece encontrarse a veces, a niveles más bajos en el LF (PERRET y col., 1985).

IX.1.2.- PROTEINAS :

Las proteínas que se encuentran en el LF han sido examinadas en varios mamíferos y también en la mujer. La cantidad de proteínas totales presentes en el LF son similares o algo menor que en el plasma (MANARANG-PANGAN y MENGE, 1971; PERRET y col., 1985). Aunque para otros autores los niveles de proteínas totales en el LF son aproximadamente la mitad que en el plasma (SINOSICH, 1987). Estas cantidades pueden variar con el ciclo, pero el contenido de proteínas en todos los folículos es similar independientemente de su tamaño (ANDERSEN y col., 1976). Las proteínas específicas muestran algunas variaciones en sus tasas; el fibrinógeno por ejemplo está presente en una concentración más baja o incluso es inexistente (MANARANG-PANGAN y MENGE, 1971).

La concentración relativa de proteínas es diferente a la del plasma. La albúmina está en mayor proporción en el LF que en el suero. Las proteínas con más alto peso molecular, tales como la Ig G, se hallan en cantidades reducidas y las proteínas de grandes pesos moleculares como la Ig M o la β_1-lipoproteínas sólo se han observado trazos (SHALGI y col., 1973).

VELAZQUEZ y col. (1977) estudiaron los aminoácidos y la composición de las proteínas de los LF de ovarios poliquísticos obtenidos mediante cirugía. Estos autores hallaron mayores cantidades de aminoácidos en LF que en plasma, aunque solamente la concentración de Cisteína era significativamente más baja en líquido folicular que en el plasma. Al agrupar los aminoácidos en relación a sus características ionizantes encontraron que la concentración de los ácidos es dos veces superior en el LF que en el plasma. No hallaron diferencias en la concentración de proteínas totales, aunque los niveles de albúmina eran mayores en el LF y el de globulinas era superior en el plasma.

El control de la permeabilidad de los capilares de los folículos antrales pequeños o grandes parece estar sujeto a los mismos factores ya que el contenido en proteínas de los líquidos recogidos de folículos maduros pequeños o grandes son con algunas variaciones, pareci-

dos (ANDERSEN y col., 1976). Además la permeabilidad de los capilares de la pared debe de ser alta, porque el contenido de proteínas del LF es muy similar a la del suero y sólamente difieren en la distribución de proteínas específicas.

Aunque la posibilidad de la existencia de una barrera hemato-folicular ha sido sugerida, la exclusión de moléculas de alto peso, mayores de $1,3x10^6$ d y la exclusión parcial del fibrinógeno, sugiere un fenómeno positivo de criba molecular. A pesar de ello se encuentran moléculas de gran peso en el LF (SIMPSON y col., 1980).

IX.1.3.- LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS :

Los parámetros lipídicos se encuentran profundamente alterados en su concentración en el LF, al compararlos con los del plasma. Los niveles de triglicéridos se hallan más bajos siempre en LF que en el plasma, mientras que el Colesterol y los fosfolípidos se encuentran a una concentración del 15 al 25% de la del plasma. Solo un 10% del total del Colesterol se detecta en forma esterificada en el LF frente a un 25 a 30% en el plasma. En LF se encuentra mayoritariamente lipoproteínas de alta densidad (HDL). La determinación de apolipo-

proteínas en LF muestra la constante presencia de Apo A_1 mientras que los valores de Apo B son indetectables (PERRET y col., 1985). La HDL aislada de LF presenta una composición de fosfolípidos similar a la que se encuentra en la HDL plasmática (PERRET y col., 1985).

IX.1.4.- **HORMONAS** :

La concentración de hormonas en el LF ha sido estudiado por GUARAYA, (1985). Los niveles de FSH y LH reflejan, en general, los de la sangre periférica, pero los niveles de PRL estan estrecha e inversamente relacionados con el volumen del LF. La concentración de esteroides refleja su estimulación y biosíntesis, siendo dependientes de las tasas de síntesis y difusión desde la teca interna y células de la granulosa.

La integridad del folículo es dependiente de la exposición secuencial de la poblaciones celulares a la FSH y LH. La PRL modela la síntesis de esteróides y la respuesta a la FSH, además de modelar el crecimiento folicular y su desarrollo (ERIKSON y col., 1985).

IX.1.5.- ENZIMAS :

SCHOCHET (1916), inició la busqueda de los mecanismos enzimáticos de la ovulación al demostrar que el LF puede atacar a la fibrina, al tejido conectivo cocido, músculo y tejido ovárico. En el LF de la mujer se han identificado entre otras las siguientes enzimas: Endopeptidasa, Aminopeptidasa, Dipeptidasa, Fosfatasa Acida y Alcalina, ATPasa, Lactico-deshidrogenasa, Hialuronidasa, Amino-Alanin transferasa, Pirofosfatasa, Kalicreina, Nucleotidasa, Tromboplastina y Colagenasa Plaminógeno, Creatina quinasa, Galactil transferasa (SINOSICH, 1987; LIPNER, 1988).

El activador de Plasminógeno en el LF puede ser la enzima que inicie la cascada de la proteolisis, degradando finalmente el colágeno que conduzca a la rotura folicular (BEERS y STRICKLAND, 1978).

IX.1.6.- PROTEOGLICANOS :

El LF de los folículos con la cavidad recien formada es semejante a la gelatina, llegando a ser más fluido aunque permanece viscoso hasta en los folículos

maduros (EDWARDS, 1974; EDWARDS y col., 1980). La síntesis de proteoglicanos en respuesta a la estimulación con FSH requiere la activación de la Adenil-ciclasa y la presencia de iones de Calcio (LENZ y col., 1982).

Los proteoglicanos que predominan en el LF de mamíferos son el Condroitín-Sulfato y el Sulfato de Heparina (MUELLER y col., 1978). Los folículos sanos tienen elevadas concentraciones de E_2 y bajas de Progesterona y Condroitín-Sulfato, mientras que los folículos atrésicos tienen bajas concentraciones de E_2 y elevadas cifras de Progesterona y Condroitín Sulfato en su LF (BELLIN y AX, 1984). Acompañando a la maduración folicular se observa una elevación en la concentración de E_2 y una disminución en la cifras de Condroitín Sulfato y Sulfato de Heparina (BUSHMEYER y col., 1985).

La importancia de los proteoglicanos en el LF es probablemente dependiente de las cargas negativas de los Glicosaminoglicanos, creando fuerzas osmóticas, tipo Donnan, e hidromecánicas (BRACE, 1981). Estas fuerzas son posiblemente las responsables del flujo de líquido a la cavidad, inicialmente lento, y la gradual expansión de la cavidad.

IX.2.- MARCADORES DE LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS EN LF :

La valoración de la madurez y calidad de los ovocitos es crítica en un programa de FIV-TE, ya que es esencial para determinar el intérvalo óptimo entre la recogida del ovocito y su inseminación.

Varios sistemas de clasificación se han utilizado según la morfología del ovocito, como anteriormente se ha referido (pag 54). Aunque posiblemente la fertilización está, a menudo, asociada con la morfología, ésta no permite un criterio absoluto ni asegura la gestación (LIU y col., 1986). Incluso se ha observado que la morfología del complejo Cúmulo-Corona-Ovocito no necesariamente se relaciona con el grado de madurez del citoplasma. Parece, que la estimulación ovárica induce una asimetría entre las células del Cúmulo y la reanudación de la meiosis (LAUFER y col., 1984d; ZENZES y col., 1985).

Como el complejo Ovocito-Cúmulo-Corona esta bañado por LF por todas partes mientras madura, muchos investigadores creen que hay una relación directa entre el contenido bioquímico, protéico, hormonal, etc., del LF y el estatus madurativo de los ovocitos (McNATTY y col., 1979b; CARSON y col., 1982; BOTERO Y RUIZ y col., 1984; LEE y col., 1987; KLEINMAN y col., 1987; BASURAY y col.,

1988). La concentración de esteroides y sustancias no esteroideas en el LF ha sido estudiado en un esfuerzo para determinar el control de los mecanismos de maduración del ovocito.

IX.2.1.- PARAMETROS FISICO-QUIMICOS :

IX.2.1.1.- VOLUMEN DEL LIQUIDO FOLICULAR :

Al ir madurando el folículo su volumen se incrementa (GREENWALD y TERRANOVA, 1988). SIMONETTI y col. (1985) compararon el volumen del LF con la madurez ovocitaria, encontrando que los ovocitos maduros se asociaban con folículos grandes. Sin embargo, la mayoría de los autores encuentran en el volumen del LF una pobre predicción del desarrollo del ovocito. (LOPATA y col., 1983; BAYER y col., 1988; SUBRAMANIAN y col., 1988).

IX.2.1.2.- VISCOSIDAD E INDICE DE REFRACCION DEL LF :

Se han intentado relacionar, sin conseguirlo, la viscosidad y el índice de refracción en el LF de pacientes tratadas con FIV-TE, con el grado de madurez de los ovocitos y su capacidad de fertilización (FISCH y col., 1989).

IX.2.1.3.- ABSORBANCIA ESPECTROFOTOMETRICA :

Se han asociado unas altas absorbancias a 455 y 415 nm en LF con ovocitos que se fertilizan, y con la capacidad de división de los embriones (BAYER y col., 1988). También se ha demostrado relación entre el contenido en Bilirrubina del LF y la referida absorbancia, suponiéndose que la Bilirrubina presente en el LF puede ser un marcador del grado de vascularización del folículo, no confirmando que la absorbancia a 455 nm se relacione con la división embrionaria (BAYER y col., 1989).

IX.2.1.4.- ECOS INTRAFOLICULARES :

La existencia de ecos intrafoliculares ecográficos parece indicar una mayor probabilidad de conseguir un embarazo en los programas de FIV-TE (ROBERT y col., 1985), sugiriendo que estos ecos son probablemente debidos a capas de células de la granulosa desprendidas de la pared del folículo que indicarían madurez.

IX.2.2.- PARAMETROS HORMONALES :

IX.2.2.1.- ESTEROIDES SEXUALES :

Los niveles de hormonas esteroideas contenidos en el LF son los parámetros más estudiados para predecir la madurez de los ovocitos. Existen muchos trabajos que estudian la concentración de E_2, Progesterona, Androstendiona (A), Testosterona (T), relacionándolos con la madurez de los ovocitos, tasas de fertilización, división y gestaciones.

El E_2 en LF es, entre los esteroides, el parámetro más analizado, estando de acuerdo la mayoría de autores en su capacidad de pronosticar la madurez ovocitaria (BOTERO-RUIZ y col., 1984; LIU y col., 1986; KREINER y col., 1987; BERGER y col., 1987; REINTHALLER y col., 1987; LEE y col., 1987; ENTMAN y col., 1987), la tasa de fertilización (WRAMSBY y col., 1981; CARSON y col., 1982; BOTERO-RUIZ y col., 1984; LIU y col., 1986; LEE y col., 1987; REINTHALLER y col., 1987; SUBRAMANIAN y col., 1988; IMOEDEMHE y SIGUE, 1988), tasa de división (LEE y col., 1987; REINTHALLER y col., 1987) y tasa de gestaciones (BOTERO-RUIZ y col., 1984; RAWLINS y col., 1985; KREINER y col., 1987). No obstante no todos los autores están de acuerdo con estos resultados (UEHARA y

col., 1985; BEN-RAFAEL y col., 1987; SINOSICH, 1987; BASURAY y col., 1988; SMITH y col., 1988).

Al igual que el E_2 la mayoría de los autores coinciden en relacionar a la Progesterona con la madurez ovocitaria (BOTERO-RUIZ y col., 1984; LIU y col., 1986; REINTHALLER y col., 1987; LEE Y y col., 1987; ENTMAN y col., 1987; DROESCH y col., 1988), tasa de fertilización (WRAMSBY y col., 1981; FISHEL y col., 1983; BEN-RAFAEL y col.,1987; REINTHALLER y col., 1987), tasa de división (BEN-RAFAEL y col., 1987) y tasa de gestaciones (FRYDMAN, 1984; BASURAY y col., 1988). Existiendo sin embargo otros trabajos que afirman lo contrario (UEHARA y col., 1985; LEE y col., 1987; BERGER y col., 1987; IMOEDEMHE y SIGUE, 1987; SINOSICH, 1987; SMITH y col., 1988; SUBRAMANIAN y col., 1988).

Para tratar de resolver estas discrepancias se ha intentado, con resultados dispares, buscar en el cociente E_2/Progesterona el parámetro ideal que indique la madurez ovocitaria (KREINER y col., 1987; BASURAY y col., 1988; HAZOUT y col., 1989) y sirva de valor pronóstico para el establecimiento de la gestación (CARZON y col., 1982; CHANNING y col., 1983; LOBO y col., 1985; LIU y col., 1986; KREINER y col., 1987; BASURAY y col., 1988).

Por último, tampoco se encuentran en la literatura datos concordantes sobre la capacidad de los diversos andrógenos (Testosterona, Androstendiona) de predecir el éxito de una FIV-TE; algunos autores los consideran unos parámetros válidos (BOTERO-RUIZ y col., 1984; UEHARA y col., 1985; REINTHALLER y col., 1987; LEE y col., 1987), mientras otros opinan lo contrario (LIU y col., 1986; BEN-RAFAEL y col., 1987; IMOEDEMNE y SIGUE, 1988).

En general, a la hora de valorar estas discrepancias, se debe tener en cuenta el protocolo de estimulación ovárica usado, pudiéndose afirmar junto con PELLICER y col. (1987b) que los niveles de esteroides en LF humano se relacionan bien con los éxitos en FIV-TE e incluso con el subsiguiente embarazo, mientras que el E_2 es útil como marcador en cualquier protocolo de estimulación usado, los niveles de Progesterona en LF solo son útiles en ciclos estimulados con CC.

IX.2.2.2.- HORMONAS HIPOFISARIAS :

GONADOTROFINAS :

Los niveles de FSH y de LH han sido relacionados con la madurez ovocitaria y las tasas de fertilización e

incluso gestaciones en los programas de FIV-TE. LAUFER y col., (1984a) observaron en pacientes estimuladas con hMG/hCG niveles de FSH mas bajos en el LF correspondiente a ovocitos morfológicamente inmaduros que en los LF de los correspondientes ovocitos intermedios o maduros. Los LF de los ovocitos que se fertilizaron tenían niveles de FSH y hCG más altos que los LF de los que no se fertilizaron. Sin embargo no encontraron relación entre la concentración de esta hormona en LF y la tasa de división embrionaria. Al utilizarse para la estimulación el protocolo que incluye CC/hMG/hCG se observan altos niveles de LH en el LF de ovocitos que terminaron en gestaciones (TESTART, 1985). Otros autores encuentran diferencias significativas entre la concentración de LH en los LF de los ovocitos que se fecundaron al compararlos con los de los que no se fecundaron (IMOEDEMHE y SIGUE, 1988)

PROLACTINA :

No está claro el papel que la Prolactina (PRL) juega en el desarrollo y madurez del ovocito, apareciendo en la literatura trabajos contradictorios. Algunos autores observan que los niveles de PRL en LF son mayores en folículos preovulatorios maduros que en los inmaduros (SUBRAMANIAN y col., 1988), encontrando en

otros estudios resultados opuestos (McNATTY y col., 1975; REINTHALLER y col., 1987; LEE y col., 1987).

De igual modo no existe acuerdo sobre la capacidad para predecir la fertilización del ovocito de la concentración de PRL en LF, habiéndose descrito niveles superiores (LAUFER y col., 1984a), inferiores (REINTHALLER y col., 1987; LEE y col., 1987; BEN-RAFAEL y col., 1987), o iguales (RAWLINS y col., 1985; PEEK y col., 1985; SUBRAMANIAN y col., 1988) en los LF cuyos ovocitos se fecundaron respecto a los LF cuyos ovocitos no se fecundaron. Estas discrepancias pueden deberse a la gran variabilidad de los niveles de PRL en el LF (LIU y col., 1986) o al método empleado en su determinación (SUBRAMANIAN y col., 1988).

IX.2.2.3.- CORTISOL :

Al analizar los niveles de Cortisol en LF en ciclos espontáneos y en ciclos estimulados con gonadotrofinas se ha encontrado que estos son significativamente más altos en los ciclos estimulados que en los no estimulados. Los folículos que contienen ovocitos inmaduros tienen menos cantidad de cortisol en el LF que los folículos con ovocitos maduros (FATEH y col., 1989), y

además existen unos niveles menores en el LF de los ovocitos que se fertilizaron y se dividieron.

IX.2.2.4.- INSULINA Y HORMONA DEL CRECIMIENTO :

DIAMOND y col. (1985) determinaron Insulina en el LF de pacientes que se estimularon con varios protocolos, observando que no había correlación entre los niveles de E_2, Androstendiona, cociente de E_2/T y los niveles de Insulina en LF, pero sí entre éstos y los niveles de Progesterona en LF. Otros autores encuentran niveles de Insulina más altos en el LF asociado a ovocitos maduros y postmaduros que en LF de ovocitos intermedios e inmaduros (URDL y col., 1989).

Se han determinado los niveles de GF-2 (INSULIN Growth factor) en LF y se han relacionado con el crecimiento folicular previo medido por ecografía, evidenciándose una relación directa. Encontrando dentro de un programa FIV-TE, que utiliza como protocolo de estimulación gonadotrofinas previa hipofisectomía médica con análogos de la Gn-RH, una relación entre los niveles de IGF-II y el número de ovocitos, calidad ovocitaria y tasa de gestaciones (BERKANE y col., 1989). Otros autores miden IGF-I en LF con diferentes protocolos de estimulación encontrado solamente diferencias significa-

tivas entre los correspondientes ovocitos maduros e inmaduros con el tratamiento con análogos de la Gn-RH/hMG pero no en los que utilizan CC/hMG (ROYERE y col., 1988). Esta diferencia en la concentración de IGF-I en LF según el protocolo de estimulación ovárica no ha sido confirmado por otros autores (HÖNIGL y col., 1989).

IX.2.2.5.- OTRAS HORMONAS :

OXITOCINA: La concentración de Oxitocina en LF obtenido mediante laparoscopia diagnóstica es unas 30 veces superior a la detectada en suero (SCHAEFFER y col., 1984). No obstante y a pesar de que la Oxitocina disminuye en LF con la madurez folicular, no se han encontrando diferencias en los niveles de esta hormona en el LF de los correspondientes ovocitos, tanto si, después de la fertilización, llegaban a implantarse como si no lo hacían (NAYUDU y col., 1983; PEEK y col., 1987), encontrando algunos autores una correlación negativa entre los niveles de Oxitocina y la concentración de Progesterona en LF. Esta observación sugiere que la concentracion de Oxitocina en LF decrece al madurar el folículo (PEEK y col., 1987).

INHIBINA : LEFEVRE y col. (1986) al comparar los niveles de Inhibina en LF con los resultados de los ovocitos correspondientes a un programa de FIV-TE concluyen que esta hormona no tiene un papel discriminativo en la tasa de fertilización de los ovocitos. Sin embargo, existen otros estudios que sugieren que la concentración de Inhibina en suero se relaciona con los niveles de E_2, número de folículos y ovocitos recogidos por laparoscopia, sugiriendo los autores que los niveles en plasma de Inhibina pueden ser un marcador útil de la función de las células de la granulosa pudiendo tener aplicaciones en los programas de FIV-TE (McLACHLAN y col., 1986).

IX.2.3.- MARCADORES BIOQUIMICOS :

IX.2.3.1.- ELECTROLITOS, GLUCOSA, ACIDO URICO Y ALGUNAS ENZIMAS :

CHANG y col., (1976), miden la concentración de varias substancias en el LF de cerdo observando que ciertos componentes del LF cambian en su concentración con el estadío madurativo del folículo: la Glucosa incrementa su niveles con la madurez del folículo, la Fosfatasa Alcalina, la GOT, el K^+ y el Fosforo decrecen con la madurez folicular mientras que el Na^+, el Ca^{++},

el Acido Urico y la Creatinina permanecen en niveles similares durante el desarrollo folicular.

IX.2.3.2.- COLESTEROL :

SIMPSON y col. (1980) refieren que el LF de ovarios humanos contiene poca o nula cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), mientras que la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) se aproxima a la que se encuentra en el plasma.

Se ha encontrado una relación entre la concentración del Colesterol en LF y los niveles de E_2 y Progesterona, pero no encuentran diferencias entre el grado de madurez de los ovocitos, su fertilización y su tasa de división (BERGER y col., 1987).

IX.2.3.3.- FOSFATASA ACIDA :

La Fosfatasa Acida (FA) ha sido aislada en tejido ovárico y en los folículos de varias especies de mamíferos. La función fisiológica de la FA en el LF humano es desconocida (PELUSO y col., 1977).

KLEINMAN y col., (1987) investigan la relación entre los niveles de FA en LF y las tasas de fertilización e implantación de los correspondientes ovocitos humanos, encontrando que los niveles de FA en LF de mujeres cuyos ovocitos no se fertilizaron fueron significativamente más bajos que los encontrados en el LF de mujeres en las que al menos un ovocito se había fertilizado. Resultados similares observaron al analizar los niveles de FA en LF y relacionarlos con la división de los ovocitos fertilizados. Los niveles de esta enzima son típicos para la mujer y no para cada folículo. Los LF de dos folículos de la misma paciente, mostraban niveles de FA similares aunque uno de los ovocitos se fertilizara y el otro no.

IX.2.3.4.- FIBRINOGENO :

La concentración de Fibrinógeno en LF es menor que en plasma (MANARANG-PANGAN y MENGE, 1971). Esto puede ser debido según STRICKLAND y BEERS (1979) a que el activador de Plasminógeno, se incrementa intensamente en el momento de la ovulación.

NAYUDU y col. (1983) encuentran una relación entre los niveles de Fibrinógeno y la capacidad de los ovocitos para implantarse. Los folículos con un ovocito que

terminaba en gestación presentaban unos niveles más bajos de Fibrinógeno que los de los folículos cuyo ovocito no llegaron a fertilizarse ni a dividirse.

IX.2.3.5.- TRANSFERRINA :

Se ha observado que la concentración de esta glicoproteína en LF puede estar relacionada con la madurez ovocitaria, encontrándose niveles mayores en los correspondientes LF de ovocitos maduros que se fertilizaron comparándolos con los folículos con ovocitos atrésicos o que no se fertilizaron (ENTMAN y col, 1984).

La concentración de Transferrina se relaciona con la morfología del ovocito maduro y con la esteroidogénesis; además los niveles de Transferrina en LF son mayores que los del plasma. Un rango intermedio de concentración de esta sustancia se asocia con una alta probabilidad de que el ovocito correspondiente llegue a fertilizarse (ENTMAN y col., 1987). En nuestra experiencia, sin embargo, no se encuentra ninguna relación entre los niveles de Transferrina y la capacidad del ovocito para fertilizarse (CASTILLA y col., 1988a). El papel de la Transferrina en la fisiología ovárica puede relacionarse con la presencia de receptores de transferrina en

las células de la granulosa de folículos maduros (ALESHIRE y col., 1989).

IX.2.3.6.- APOLIPOPROTEINA E :

La Apolipoproteína E (Apo E) es una glicoproteína de 34 Kd que se encuentra en varias clases de lipoproteínas. BROWN y col., (1989) estudian la presencia de la Apo E en el LF humano, detectándola tanto en ciclos estimulados con FSH/hMG como en ciclos no estimulados.

La concentración de la Apo E en LF es unas 10 veces superior a la del suero. Los niveles de Apo E en el LF varían con el momento de la fase folicular del ciclo menstrual, disminuyendo dramáticamente con el aumento de E_2 en el suero. Estos cambios junto a los múltiples papeles que la Apo E juega en los tejidos sugiere que esta substancia interviene de una manera importante en el mecanismo ovárico (BROWN y col., 1989).

IX.2.3.7.- GLICOSAMINOGLICANOS :

Dos tipos de glicosaminoglicanos (GAGs) se encuentran en el LF: Acido Hialurónico y Condroitín Sulfato, de varias especies de mamíferos (LIPNER, 1988). La

información sobre la composición de GAGs en el LF humano es incompleta. BUSHMEYER y col. (1985) han publicado que folículos sanos de bóvidos tienen una concentración baja de GAGs mientras que folículos atrésicos tienen una concentración alta, dando la idea de que la concentración de GAGs decrece con la madurez folicular considerándola como un marcador de la madurez folicular. En cambio, BELLIN y col. (1986) encuentra Condroitín Sulfato y Sulfato de Heparina en el LF de pacientes a las que se estimula la ovulación con hMG/hCG, observando que la concentración de Condroitín Sulfato se relaciona positivamente con una alta tasa de fertilización de los ovocitos, mientras que los niveles de Sulfato de Heparina se incrementan en el LF de los ovocitos maduros.

IX.2.3.8.- SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA :

FERNANDEZ y col. (1985) midieron la actividad de la Renina en LF de mujeres estimuladas con hMG/hCG, incluidas en un programa de FIV-TE, encontrando una actividad significativamente más alta en el LF que en el plasma, también observaron una correlación positiva entre el E_2 y la Renina del LF. El mismo grupo de investigadores indican que las muestras de LF contienen aproximadamente 8 veces más Angiotensina II que el plasma. Esta diferencia sugiere un origen ovárico para este compuesto

aunque el mecanismo por el que se concentra en el LF no se conoce.

PAULSON y col. (1989) investigan la producción del sistema Renina-Angiotensina en las células de la teca interna, encontrando que las células de la teca del ovário producen Renina "in vitro" aunque su producción no se relaciona con la madurez ovocitaria ni con la concentración de esteroides en el LF "in vivo".

IX.2.3.9.- α1-ANTITRIPSINA (α1-AT):

La α1-AT es un inhibidor de la Tripsina, Quimotripsina y Elastasa que son enzimas degradativas, habiéndose observado que los niveles de esta proteína predicen el resultado de la fertilización de sus ovocitos (IMOEDEMHE y SHAW, 1986), además de ser su concentración significativamente mayor en los LF correspondientes a los ovocitos que terminaron en embarazo, en ciclos en que sólo se transfería un embrión, comparándolos con la de los LF de los ovocitos que no se dividieron (NAYUDU y col., 1983).

IMOEDEMHE y SIGUE (1988) comparan los niveles de α1-AT, E_2, Progesterona, T y LH en muestras de LF correspondientes a ovocitos fertilizados con los de otro

grupo que no se habían fertilizado, encontrando diferencias significativas en los niveles de α1-AT entre ambos grupos. También evidenciaron unas correlaciones negativas entre α_1-AT y los niveles de E_2 y LH, y correlaciones positivas entre los niveles de E_2 y LH.

IX.2.4.- MARCADORES INMUNOLOGICOS :

IX.2.4.1.- LINFOCITOS :

Se ha detectado la presencia de diferentes poblaciones linfocitarias en LF de pacientes sometidas a una FIV-TE, estimuladas con gonadotrofinas (DROESCH y col., 1988) o con CC más gonadotrofinas (HILL y col., 1987; CASTILLA y col., 1989b). En nuestra unidad se ha demostrado un alto porcentaje de células T $CD8^+$ (supresoras/citotóxicas) en LF (CASTILLA y col., 1989a), lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores al analizar LF tras estimulación con el mismo protocolo (CC/hMG/hCG) (HILL y col., 1987). DROESCH y col. (1988) observaron que la concentración de linfocitos T disminuye con la madurez del ovocito, sin afectarse la relación entre linfocitos T $CD4^+$ (helper/inducer) / $CD8^+$.

IX.2.4.2.- ACTIVIDAD QUIMIOTACTICA :

La actividad quimiotáctica del LF de pacientes a las que se les realiza una FIV-TE era mayor en las se hacían gestantes, que en las que no conseguían una gestación, mientras que en el suero sucedía al contrario, siendo la actividad quimiotáctica más baja en las pacientes que llegaban a la gestación (HERRIOT y col., 1986).

IX.2.4.3.- TIMOSINA α-1 :

Esta sustancia se detectó por primera vez en las células epiteliales del Timo. Su mayor actividad biológica se relaciona con la amplificación y modulación de la inmunidad celular. La Timosina α-1 estimula la producción de linfocinas (LOW y col., 1979).

La concentración de Timosina α-1 en LF es mayor que en suero, además los niveles de timosina en LF de ovocitos inmaduros son menores a los encontrados en el LF de ovocitos maduros o de madurez intermedia (NAZ y col., 1987).

IX.2.4.4.- INMUNOGLOBULINA G :

Se ha demostrado una relación positiva entre los niveles de Ig G en LF y la capacidad de los correspondientes ovocitos para implantarse (NAYUDU y col., 1983).

IX.2.4.5.- PROPIEDADES INMUNOREGULADORAS DEL LF :

Se ha demostrado que el LF humano puede inhibir la proliferación linfocitaria inducida por Concanavalina A (Con A) (CASTILLA y col., 1988b). En estudios posteriores no se hallaron diferencias en la capacidad de inhibición de la respuesta de linfocitos a la Con A en los LF procedentes de foliculos cuyos ovocitos se habían fecundado, al compararlos con la de los LF de los ovocitos que no se habian fecundado (CASTILLA y col., 1989b; CASTILLA y col., 1990).

IX.2.5.- ANALISIS DE LAS SUSTANCIAS SECRETADAS POR LAS CELULAS DE LA GRANULOSA "IN VITRO" :

IX.2.5.1.- PROTEINAS :

Aunque la mayor parte de los componentes protéicos del LF se encuentran a una concentración similar a la

del suero, es posible que componentes exclusivos del LF puedan existir en él aunque al estar a concentraciones muy bajas no se detecten por análisis electroforéticos. Por ello se ha intentado cultivar células de la granulosa "in vitro" y analizar las proteínas segregadas en cultivo, no encontrándose diferencias entre los cultivos de células de folículos maduros y las procedentes de folículos inmaduros (LIU y col., 1986).

En un intento para desarrollar métodos más sensibles para determinar la producción de proteínas por las células de la granulosa en cultivos, se utilizaron precursores radioactivos como trazadores de las glicoproteínas sintetizadas y segregadas en los cultivos. Se observó un incremento en la síntesis de proteínas de peso molecular de 33.000 d por las células de la granulosa de folículos maduros al compararlas con células de la granulosa de folículos inmaduros (LIU y col., 1986).

IX.2.5.2- ESTEROIDES :

Células Complejo Cúmulo-Corona-Ovocito : Se ha intentado relacionar la producción hormonal por las células del Complejo Cúmulo-Corona-Ovocito, con la posibilidad de prever la fertilización de los ovocitos, no existiendo un acuerdo generalizado en este sentido, al parecer por

las diferentes condiciones de cultivo (LAUFER y col., 1984b).

Mientras unos autores no observan ningún tipo de relación (McNATTY y col., 1980; SHEA y col., 1975), otros como LAUFER y col. (1984b) encuentran que : A) El Complejo Cúmulo-Corona-Ovocito de los ovocitos intermedios y maduros segregan, significativamente, mayores niveles de E_2 y Progesterona que el complejo de ovocitos inmaduros; B) El complejo de las células asociadas a los ovocitos que se fecundaron producían significativamente mayores niveles de Progesterona que los de los ovocitos no fertilizados, mientras que los niveles de T y E_2 eran similares en ambos tipos; C) El cociente E_2/T era mayor en los complejos de ovocitos que continuaban su división y D) Aquellos complejos cuyos ovocitos se asociaban con embarazo segregaban menos T que los que no llegaban a la gestación. Concluyendo, que la secreción de esteroides por el complejo Cúmulo-Corona-Ovocito juega un importante papel en la maduración y fertilización de los ovocitos (LAUFER y col., 1984b; LAUFER y col., 1985).

Células de la granulosa : La producción de esteróides por las células de la granulosa en cultivos también ha sido evaluada, dependiendo su producción del tipo de hormona que estimule a estas células, tanto "in vitro" como "in vivo" (McNATTY, 1975; DENNEFORS y col., 1983).

LIU y col. (1986) encontraron un buen indicador de la madurez de los ovocitos en la producción de E_2 por las células de la granulosa y en el cociente E_2/Progesterona un indicador de la luteinización lo que sirve además para predecir con exactitud la calidad del ovocito asociado.

Algunos autores miden la actividad aromatasa en células de la granulosa humanas y observan que las células asociadas a ovocitos inmaduros tienen mayor actividad aromatasa, y que la disminución de esta actividad se asocia con la madurez folicular (POLAN y col., 1984). Sin embargo HILLIER y col. (1984) no fueron capaces de relacionar la tasa de fertilización y división con la esteroidogénesis "in vitro" de las células de la granulosa obtenidas en la aspiración de los folículos preovulatorios.

Células de la granulosa luteinizadas : HILL y col. (1987) estudiaron la producción de Progesterona por las células luteinizadas de la granulosa en cultivos tardios (3-6 días), encontrando que la producción de Progesterona es mayor en los cultivos de células de la granulosa provenientes de los ovocitos que se habían fecundando, comparándola con los cultivos de células de la granulosa de ovocitos que no se habían fecundado. Además, los mismos autores, observan niveles superiores de recepto-

res para LH/hCG, tras 6 días de incubación, en las células granuloso-luteínicas procedentes de folículos cuyo ovocito se había fecundado.

IX.2.6.- OTROS MARCADORES :

IX.2.6.1.- PROSTAGLANDINAS :

Las prostanglandinas (PG) tienen una misión importante en la reproducción siendo fundamentales en los momentos ovulatorios (LIPNER, 1988). SEIBEL y col. (1984) al estudiar el LF de folículos aspirados procedentes de mujeres a las que se les realizaba una laparoscopia diagnóstica encontraron una buena relación entre los niveles de $PGF_{2\alpha}$ y la madurez folicular.

PELLICER y col. (1987a) estudiaron el nivel de $PGF_{2\alpha}$ como marcador de la madurez del folículo en un programa de FIV-TE estimulando los ovarios con hMG/hCG, no encontrando diferencias significativas entre los niveles de los LF correspondientes a ovocitos maduros, intermedios o inmaduros. Tampoco observaron una capacidad predictiva de las concentraciones de $PGF_{2\alpha}$ respecto a los potenciales de fertilización y de implantación. Sin embargo, otro grupo de investigadores encuentran niveles mayores de $PGF_{2\alpha}$ en LF de folículos maduros que

en los de inmaduros (FEICHTINGER y col., 1982). Se ha comprobado que cuando se estimula la ovulación con análogos de la Gn-RH, los niveles de $PGF_{2\alpha}$ y PGE sí se relacionan con el estadío madurativo folicular (SMITH y col., 1988).

IX.2.6.2.- PROTEINAS PLACENTARIAS :

Una serie de estudios demuestran la presencia de Proteínas Placentarias (PP) en el LF humano. SEPPALA y col., (1984) midieron en el LF preovulatorio la concentración de la PP-5, consiguiendo correlacionarla significativamente con los niveles de E_2 en LF, pero no se relacionaba con la habilidad de los ovocitos para fertilizarse y posteriormente dividirse. También, la PP-12 mostró una correlación con los niveles de E_2 y Progesterona en los LF de pacientes incluidas en un programa de FIV-TE (SEPPALA y col., 1985). Por último, la proteína placentaria A asociada al embarazo (PAPP-A) parece servir como índice de madurez folicular pero no presenta la capacidad de predecir la fertilización de los ovocitos (SINOSICH, 1987) ni el índice de implantación de los ovocitos fertilizados (STANGER y col., 1985).

IX.2.6.3.- ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO (AMP_c) :

Algunas evidencias experimentales sugieren que el AMP_c es una sustancia fisiológicamente importante en la inhibición de la madurez de los ovocitos de mamíferos (DOWNS y EPPIG, 1984; BORNSLEGER y SCHULTZ, 198[illegible], siendo esta inhibición más intensa en los ovocitos con Cúmulo que en los gametos desnudados (SUZUKI y col., 1987). Estudiando los niveles de AMP_c en LF se ha observado que los ovocitos que llegaron a implantarse tenían las concentraciones más bajas (TARLATZIS y col., 1985).

IX.2.6.4.- ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO :

La degradación enzimática de la pared del folículo, es probablemente la mejor hipótesis para explicar la rotura folicular. El sistema Activador Plasminógeno-Plasmina es la más reciente y probable explicación de los mecanismos que inician la cascada que conduce a la rotura folicular (LIPNER, 1988). Sin embargo, a la hora de asociar la actividad del Activador del Plasminógeno con la fecundabilidad ovocitaria no existe un acuerdo general.

En los ciclos no estimulados existe una correlación significativa entre la actividad del Activador de

Plasminógeno y los niveles de E_2. Sin embargo en los ciclos estimulados con CC/hMG/hCG no se observa esta correlación (WEIMER y col., 1985). Otros autores encuentran una actividad fibrinolítica de Activador Plasminógeno significativamente mayor en LF correspondiente a ovocitos que más tarde se fertilizan que el encontrado en LF asociado a ovocitos que no lo hacen (MILWIDSKY y col., 1989).

IX.2.6.5.- PROTEINA REGULADORA FOLICULAR :

Esta proteína fue descubierta por DiZEREGA y col. (1983) en el LF, estando positivamente correlacionada con los niveles en LF de E_2 e Inhibina e inversamente con los niveles de Progesterona en ciclos espontáneos, no encontrando en ciclos estimulados esta relación (DiZEREGA y col., 1983).

IX.2.6.6.- INHIBIDOR DE LA MADURACION DEL OVOCITO :

La reanudación de la meiosis en el ovocito sólo se realiza momentos antes de la ovulación. En la literatura existen trabajos que demuestran la existencia en el LF de substancias que regulan este proceso (TSAFRIRI y CHANNING, 1975; WESTERGAARD y col., 1984).

Tanto las sustancias inhibidoras como la estimuladoras han sido estudiadas en los programas de FIV-TE, observándose en ciclos estimulados con hMG/hCG que los LF de folículos menos maduros ejercen una actividad inhibidora mayor que los LF de los folículos maduros. (CHANNING y col., 1983). Otros trabajos refieren que dos de cada tres de los LF de ovocitos preovulatorios no ejercen actividad inhibidora de la meiosis, sugiriendo que esta actividad va disminuyendo con la madurez folicular (HILLENSJO y col., 1985). WESTERGAARD y col. (1985), sin embargo, encontraron diferencias entre los folículos humanos atrésicos y los sanos, hallando en el 75 % de los folículos preovulatorios una actividad estimuladora de la meiosis. Este mismo grupo encontró alta actividad estimuladora en LF de folículos que contenían un ovocito que se había fecundado y dividido, no observándose actividad estimuladora en los LF de los ovocitos que no se fecundaron (WESTERGAARD y col., 1895).

IX.2.6.7.- ß - ENDORFINAS :

Se ha detectado una alta concentración de ß-endorfina (ß-EP) en LF (PETRAGLIA y col.,1985). Los folículos que contienen ovocitos morfológicamente maduros presentan niveles ligeramente más bajos de ß-EP. El contenido

total de esta substancia es similar en los folículos de diferentes grados de madurez. Bajos niveles de ß-EP en el LF se asocian a un mayor potencial de desarrollo de los ovocitos fecundados. Altas concentración de ß-EP se asocian con ovocitos que no se dividen después de la fertilización (TAM y col., 1988).

IX.2.6.8.- LAMININA P_1 Y PROCOLAGENO TIPO III :

Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la alteración de la membrana basal perifolicular y de la matriz intersticial durante la maduración de los ovocitos (CHRISTIANE y col., 1988). Los niveles laminina P_1, un marcador de la membrana basal, y del procolágeno tipo III, un marcador del tejido conectivo intersticial, se correlacionan con los niveles de Progesterona, pero no con los niveles de E_2 y T de LF de ciclos estimulados.

IX.2.6.9.- HISTAMINA :

Se ha estudiado la concentración de histamina en el LF de pacientes sometidas a FIV-TE, no encontrándose relación con la madurez folicular, pero detectándose, sin embargo, un incremento de los niveles de Histamina en el LF, en aquellas pacientes que presentaban un

síndrome adherencial pelviano, lo que podría perjudicar el desarrollo ovocitario (SHRIVASTAV y col., 1988).

IX.2.6.10.- ESTUDIO CITOLOGICO :

LEUNG y col., (1983), descubrieron una técnica citológica para asegurar el grado de luteinización y vacuolización de las células del Cúmulo. Los autores proponen un puntaje de acuerdo con la sudanofilia del citoplasma de las células y la presencia o ausencia de vacuolas, indicando que los ovocitos tienen una pobre tasa de fertilización y potencial desarrollo si las células de su cúmulo están fuertemente luteinizadas o vacuoladas.

Otros autores consiguen mediante el estudio de las células de la granulosa al microscopio electrónico, relacionar las finas estructuras de estas células con la habilidad de los ovocitos para ser fecundados (ROTMENSCH y col., 1986).

IX.2.6.11.- CA-125 :

ACIEN y col. (1988). observaron que el antígeno CA-125 esta presente en el LF generalmente a una concentra-

ción inferior a la del suero y que la presencia de altos niveles de CA-125 tanto en suero como en LF, en pacientes sometidas a FIV-TE y GIFT, interfieren con la fertilización, implantación y posterior embarazo.

IX.2.6.12.- GLOBULINA FIJADORA DE HORMONAS SEXUALES (SHBG) Y PROTEINA FIJADORA DE CORTISOL (CBP) :

Los niveles de Globulina Fijadora de Hormonas Sexuales y de Proteína Fijadora de Cortisol fueron medidas por ANDERSEN y col. (1989) en LF y en suero de mujeres que se sometieron a FIV-TE, concluyendo que las concentraciones de SHBG y CBP tanto en suero como en LF, pueden ser un buen parámetro para predecir los éxitos en FIV-TE. Otros autores, sin embargo, encuentran bajas concentraciones de SHBG en folículos atrésicos (BEN-RAFAEL y col., 1986) y no relacionan su concentración con la capacidad de fecundarse el ovocito correspondiente (BEN-RAFAEL y col., 1987).

IX.2.6.13.- ACTIVIDAD PROTEASA DEL LF SOBRE EL COLAGENO (TIPO IV) DE LAS MEMBRANAS BASALES

Se ha medido la actividad proteasa del LF sobre el colágeno tipo IV de las membrana basal, observándose un

incremento cerca de la ovulación (PUISTOLA y col., 1986). Sin embargo, esta sustancia no se relaciona con la madurez ovocitaria en los ciclos estimulados (RONNBERG y col., 1988).

Como hemos visto los niveles de muchas substancias han sido medidos en LF para ver si se relacionan con la madurez ovocitaria, su capacidad de fecundación y su potencial de desarrollo. Sin embargo, en la actualidad, no hay en la literatura un acuerdo general en los resultados obtenidos.

OBJETIVOS

Los programas de FIV-TE, son el único tratamiento para algunas esterilidades de origen tubárico. Sin embargo, esta técnica tiene una serie de aspectos que no estan aún totalmente resueltas, siendo una de las fundamentales la valoración de la madurez ovocitaria, su capacidad de fecundarse y su potencial de desarrollo.

No existe un acuerdo general para poder predecir la calidad ovocitaria. El conocer " a priori" la calidad y capacidad de desarrollo de los ovocitos sería de gran utilidad en los programas FIV-TE, además de ampliar los conocimientos sobre la Fisiología de la Reproducción.

En esta tesis nos proponemos realizar un estudio de diversos parámetros bioquímicos y hormonales en LF y relacionarlos con la capacidad de fecundarse el ovocito y su desarrollo posterior.

MATERIAL Y METODO

I.- INSTRUMENTOS Y REACTIVOS :

I.1.- INSTRUMENTOS

- Ecógrafo EUB-26 (HITACHI, Japon).
- Equipo de laparoscopia (R. WOLF, R. F. Alemania).
- Pinzas de agarre atraumáticas 8383.03 (R. WOLF, R. F. Alemania).
- Equipo de punción folicular 8373.05 (R. WOLF, R. F. Alemania).
- Aspirador Suctor BV low vacuum (M. MEDICAS, España).
- Cámara estéril de flujo laminar AH-10 (TELSTAR, España).
- Incubadora MNS C- 2.600, (WILD - LEITZ, Francia).
- Estufa 205 (SELECTA, España).
- Centrífuga Centrónic (SELECTA, España).
- Estereomicroscopio VMZ (OLYMPUS, Japon).
- Microscopio de visión invertida IM (OLYMPUS, Japón).
- Micropeachímetro 2001 (CRISON, España).
- Frigorífico (ZANUSSI, España).
- Congelador (ZANUSSI, España).
- Sistema de gases para incubadora (SOCIEDAD ESPAÑOLA DE OXIGENO, España).

- Micropipetas automáticas (BECKMAN, USA).
- Cámara de recuento microscópico celular Neubauer (BLAUBRAND, R.F. Alemania).
- Analizador automatizado HITACHI 737 (HITACHI, Japón).
- Nefelómetro ARRAY PROTEIN SYSTEM (BECKMAN, USA).
- Baño termostatizado (SELECTA, España).
- Agitador continuo (GRICEL 24, España).
- Espectofotómetro Ovation II (TERUMO, USA).
- Contador automático de R.I.A. 400 CGD (PACKARD, USA).

I.2.- MATERIAL DESECHABLE

- Tubos de cultivo 16x100 y 12x75 (COSTAR, Cambridge, USA).
- Placas de Petri 35x10 y 60x15 (NUNC, Dinamarca).
- Filtros estériles Millex GS de 0.22 µm (MILLIPO RE, Francia).
- Pipetas de Pasteur de plástico (LABOPLAT, España).
- Pipetas de Pasteur de vidrio (KRAPE, España).
- Puntas de pipetas automática (DASLAB, España).
- Cubreobjetos y portaobjetos.

I.3.- REACTIVOS:

- Heparina sódica (BOIZOT, España).
- Inra Menezo B-2 (Api - System, Francia).
- Medio de cultivo RPMI:

A 900 ml de agua bidestilada se añade:

- RPMI - 1640 (Flow)..... 10,00 g.
- Bicarbonato Sódico (Merck)..... 2,00 g.
- Ampicilina (Antibióticos S.A.)... 0,50 g.
- Gentamicina (Antibióticos S.A.).. 0,04 g.
- L-Glutamina (Flow Laboratories).. 0,50 g.
- Hepes buffer (Flow Laboratories). 3,50 g.

Esta mezcla tras agitación y ajuste a pH = 7,4 se lleva a un volumen de 1000 ml con agua bidestilada.

II.- **FARMACOS** :

II.1.- ESTIMULACION OVARICA:

- Citrato de Clomifeno: Omifín (Merrel Dow España S.A. Madrid, España).
- hMG : Pergonal 500 (Serono S.A. Madrid, España).
- hCG : Profasi 2.500 (Serono S.A. Madrid, España).

II.2.- ANESTESIA EN LA LAPAROSCOPIA :

- Droperidol: Dehidrobenzoperidol, (Syntex Latino, Barcelona, España).
- Fentanilo: Fentanest, (Syntex Latino, Barcelona, España).
- Atropina Miró: (Lafsa, Jaén, España).
- Tiopental sódico: Pentothal, (Abbott, Madrid, España).
- Relajantes musculares:
  - R. Atracurio: Tracrium, (Gayoso Wellcome, Madrid, España).
  - B. Pancuronio: Pavulon, (Organon, Barcelona, España).
- Gases:
  - Oxígeno (Sociedad Española de Oxigeno, España).
  - Protóxido (Sociedad Española de Oxigeno, España).

III.- METODO :

III.1.- PROTOCOLO DE ESTIMULACION OVARICA:

La estimulación ovárica se llevó a cabo mediante la administración de Citrato de Clomifeno y hMG. El CC se

administró a dosis de 100 mgr día, comenzando el 3º día del ciclo, durante 5 días. Al 7º día del ciclo, se inician los controles diarios de la estimulación: determinaciones de E_2 en plasma (ver método bioquímicos pag. 133) y medición de los diámetros foliculares por ecografía. A partir del día 7º del ciclo, se empezó a administrar hMG, dependiendo la dosis de los valores diarios de los parámetros de control de la estimulación.

En el momento en que aparece al menos un folículo con un diámetro igual o mayor de 16 mm, se empieza a determinar LH en sangre periférica cada 12 horas, para detectar un posible ascenso endógeno de esta hormona (ver método bioquímicos pag.133).

Cuando los parámetros de monitorización indicaron la existencia de folículos maduros, se administraron a las pacientes 5000 UI de hCG.

III.2.- PUNCION FOLICULAR :

La punción folicular se realiza, generalmente, a las 35 horas de la administración de la hCG; antes de que se produzca la ovulación.

La laparoscopia se lleva a cabo en el quirófano, con la paciente en posición de litotomía dorsal, no utilizando instrumentos por via vaginal durante el proceso. Se emplea anestesia general con intubación endotraqueal.

Una vez esterilizado el abdomen con yoduro de povidona, se produce el neumoperitoneo usando CO_2, evaluando las condiciones de la pared abdominal y de la cavidad pelviana con la paciente en posición de 25º a 30º de Trendelenburg.

Una segunda punción suprapúbica bajo control visual directo permite introducir una pinza atraumática para las maniobras intrapélvicas. La punción folicular se realiza mediante un equipo especial (8373.05 R.WOLF) con aguja recubierta de teflón, que es introducida en la cavidad abdominal por la línea media a unos centímetros de la sínfisis púbica. La presión de aspiración para la recogida del líquido folicular es de 100 mm de Hg conseguida por medio de un aspirador tipo suctor BV, conectado al sistema de vacio del quirófano.

El ovario se expone pinzando el ligamento utero-ovárico. Una vez que se fija el ovario, mediante una pinza atraumática, y se selecciona el folículo, que se va a aspirar, se lleva a cabo la punción tratando de no

producir un desgarro en la pared folicular. La aspiración comienza por los folículos de mayor tamaño. Al realizar la succión se produce un colapso rápido de la pared del folículo; en caso contrario es necesario rotar la aguja o retirarla ligeramente hasta vaciar el folículo. El contenido del folículo aspirado se envia rápidamente al laboratorio de Fertilización "in vitro" para comprobar de inmediato la presencia del ovocito en el LF.

Mientras en el laboratorio se busca el ovocito en el LF, el equipo quirúrgico procede a lavar el folículo con medio de cultivo RPMI, suplementado con heparina sódica, mediante una jeringa, que se conecta a la aguja de punción, introduciendo un volumen semejante al del folículo aspirado. La técnica de lavar el folículo inmediatamente después de haberlo aspirado tiene la ventaja de acortar el tiempo total del procedimiento, efectuando la irrigación antes de que exista una hemorragia dentro del folículo y se forme un coágulo. Si no se encuentra el ovocito se lava de nuevo el folículo de la misma manera.

Con cada folículo, se repite el mismo procedimiento de aspiración del LF y posterior lavado de la cavidad antral.

III.3.- LABORATORIO DE FERTILIZACION IN VITRO :

III.3.1.- IDENTIFICACION Y CLASIFICACION DE LOS OVOCITOS:

Una vez que los LF llegan al laboratorio, debidamente identificados, se inicia la busqueda del ovocito. Para ello se depositan, dentro de la incubadora, en una placa de Petri de 60x15 mm y bajo visión estereomicroscópica, se observan para identificar el ovocito. Si no se encuentra en el LF, se busca de la misma manera en el líquido del lavado folicular.

Identificado el ovocito, mediante una pipeta de Pasteur se coloca en una nueva placa de Petri de 35x10 mm en el interior de unas gotas de medio de cultivo Menezo B-2, previamente gasificado y calentado a 37º C, para su observación y clasificación. Nosotros utilizamos la clasificación de TESTART (ver Introducción pag. 61), en ella los ovocitos se clasifican en maduros (+++), intermedios(++), inmaduros (+) y Vesícula Germinal (0) dependiendo de: estadío del núcleo, apariencia de la Corona Radiada, grado de expansión del Cúmulo y aspecto de las células de la granulosa. En caso de duda sobre la madurez del ovocito se valora en el microscopio de visión invertida.

Una vez clasificados los ovocitos se colocan, en tubos de cultivo de 12x75 mm con 0.5 cc de medio Menezo B-2, en la incubadora a temperatura de 37ºC, 95% de humedad y al 5% de CO_2.

III.3.2.-PREPARACION DEL SEMEN :

El semen se obtuvo por masturbación, en recipiente estéril, previo lavado de manos y genitales con una solución germicida y después de abstinencia sexual previa de unos 3 días. Una vez recogido el semen se deja a temperatura ambiente para que se licue durante 30 minutos. Todas las manipulaciones del eyaculado se realizan dentro de la campana de flujo laminar con instrumental estéril. Una pequeña muestra de semen se utiliza para observar de manera sucinta la motilidad espermática y demás parámetros del espermiograma.

La preparación del semen se llevó a cabo mediante la técnica de "Swim-up" (DEVRIUS,1971) que consiste en repartir la muestra del semen en tubos de cultivo de 17x100 mm depositando en cada uno de ellos 1 ml de semen junto a 3 ml de medio de cultivo Menezo B-2 tras agitación se centrifuga a 300 g durante 7 minutos. El sobrenadante se retira con una pipeta Pasteur y el

pellet se disgrega mediante unos golpes enérgicos en el fondo del tubo, añadiéndose 5 ml de medio de cultivo a este tubo, agitándose suavemente. La solución se pasa al tubo siguiente con el pellet ya disgregado, volviéndose a agitar suavemente, la operación se repite con todos los tubos que se habían preparado. El tubo final se centrifuga nuevamente.

Al pellet resultante se le añade cuidadosamente 1 ml de medio de cultivo y se centrifuga durante 15 segundos, para depositar las partículas más groseras que pudieran haber sido disgregadas; a continuación se coloca en la incubadora para que los espermatozoides móviles difundan al medio de cultivo. A los 20 ó 30 minutos se recogen mediante una pipeta, aproximadamente 0,7 ml del sobrenadante, pasándolo a un tubo de cultivo de 12x75 mm, en el que permanecen hasta la inseminación.

Una pequeña muestra de esta preparación se observa al microscopio valorando los parámetros seminales, incluyendo el recuento en cámara de Neubauer de los espermatozoides móviles.

III.3.3.- INSEMINACION :

Concluido el periodo de incubación del ovocito, se procede a realizar la inseminación, también dentro de la incubadora, mediante micropipeta; añadiendo entre 50.000 a 100.000 espermatozoides móviles/ml al medio de cultivo en que se encuentran los gametos femeninos.

III.3.4.- SIGNOS DE FECUNDACION :

Aproximadamente a las 17 - 18 horas de la inseminación, se localiza el ovocito con la ayuda del estereomicroscopio y en una placa de Petri de 35x10 mm se libera del cúmulo, si no lo estaba ya por la acción de las enzimas espermáticas, tratando de observar los signos de fertilización (ver introducción pag. 68). En caso de duda se utiliza el microscopio de visión invertida.

Observados los pronúcleos y corpúsculos polares, aislada o conjuntamente, se traslada el ovocito a un nuevo tubo de cultivo de 12x75 mm con medio Menezo B-2.

III.3.5.- PRIMERAS DIVISIONES DEL EMBRION :

A las 43 horas de la inseminación con la ayuda del estereomicroscopio y en placa de Petri de 35x10 se observan los embriones para ver el número de blastómeras en que se encuentran, la uniformidad de su tamaño, las características de su citoplasma y la existencia de restos en su interior.

IV.- LIQUIDOS FOLICULARES :

Los LF que se han utilizado en este estudio provenian de pacientes de nuestro programa de FIV - TE, cuya indicación era la existencia de un factor tubárico definitivo. En todos los casos el estudio del factor masculino era completamente normal.

La estimulación ovárica presentó en todas las pacientes unos niveles de E_2 en sangre periférica superiores a 1000 pg/ml y 2-3 folículos con un diámetro de 18 mm o más eran observados por ecografía. No hubo en ninguna de estas pacientes LH endogena.

Los LF fueron claros macroscópicamente, sin estar contaminados de sangre, apareciendo solamente un ovocito, en cada LF. Todos los ovocitos fueron clasificados

por su morfología como maduros (+++). Una vez encontrado el gameto femenino, se centrifugaron los LF a 600 g durante 10 minutos, y se hicieron diferentes aliquotas del sobrenadante, las cuales se congelaron a -80º C, hasta el momento de su estudio.

Los LF se dividieron en dos grupos según el ovocito correspondiente se fecundara o no.

IV.1.- LF DE OVOCITOS NO FECUNDADOS:

Los ovocitos correspondientes a los LF de este grupo no presentaron ningún signo de fecundación a las 17 - 18 horas de la inseminación, ni posteriormente se dividieron. Se utilizaron como grupo de ovocitos no fertilizados los pertenecientes a pacientes que tenían otros ovocitos fertilizados.

IV.2.- LF DE OVOCITOS FECUNDADOS :

Los ovocitos correspondientes a los LF de este grupo presentaron claramente dos pronúcleos y corpúsculos polares aislada o conjuntamente y todos los embriones se dividieron.

Estos LF fueron divididos en dos subgrupos dependiendo del número de blastómeras en el momento de la transferencia, 43 horas después de la inseminación :

- Menos de 4 blastómeras
- 4 ó más blastómeras

V.- METODOS BIOQUIMICOS

V.1.- HORMONAS

V.1.1.- ESTRADIOL y PROGESTERONA

Estas hormonas se estudiaron por radioinmunoensayo (RIA) mediante kits comerciales (Sorin Biomédica). El principio de este ensayo esta basado en la competición por fijarse entre la hormona marcada con un isótopo radiactivo y la contenida en la prueba standard o en las muestras problema, a los anticuerpos anti-hormona unidos a una fase sólida (tubo). Tras incubación y lavado, la cantidad de hormona marcada fijada es inversamente proporcional a la cantidad de hormona presente en la muestra.

V.1.2.- FSH, LH y PRL

Se determinaron por ensayo inmunoenzimático (ELISA), mediante Kits comerciales (Terumo Medical Corporation). Las muestras de LF se hacen reaccionar con una bola de plástico (fase sólida) que lleva fijado un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único lugar antigénico de la hormona a determinar, y con un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima dirigido a diferentes lugares antigénicos de la molécula de la hormona a determinar. Se produce la formación del siguiente "sandwich": fase sólida/hormona/anticuerpo conjugado. La bola se lava para eliminar el anticuerpo marcado no ligado y a continuación se incuba con un substrato del enzima. La cantidad de substrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia de la reacción en un espectrofotómetro. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de hormona de la muestra. Cada prueba se realizó por duplicado.

V.2.- DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINAS, C3 y C4

Los niveles en LF de inmunoglobulinas (Ig) G, A y M, y de los factores C3 y C4 del sistema del complemento se midieron mediante nefelometría. En esta técnica el

antisuero (BECKMAN) correspondiente se mezcla con la muestra de LF. A continuación se mide la dispersión de la luz causada por los pequeños complejos antígeno-anticuerpo formados, y se compara con soluciones de antígeno patrón (BECKMAN).

V.3.- OTRAS PROTEINAS

Se determinaron por nefelometría, utilizando antisueros Beckman, la concentración en LF de las siguientes proteínas:

- α1 Glicoproteína Acida
- α1 Antitripsina
- α2 Macroglobulina
- Albúmina
- Transferrina

V.4.- ENZIMAS

Se determinaron utilizando kits comerciales (BOEHRINGER MAMMHEIM) y el analizador automatizado HITACHI 737, las siguientes enzimas:

- Fosfatasa Acida
- Láctico Deshidrogenasa (LDH)
- Creatina quinasa (CK)

V.5.- PERFIL LIPIDICO

V.5.1.- TRIGLICERIDOS Y COLESTEROL TOTAL

El colesterol total y los triglicéridos se determinaron enzimáticamente (CHOD-PAP y GPO-PAP de BOEHRINGER MANNHEIM, respectivamente) mediante el analizador automatizado HITACHI 737.

V.5.2.- LIPOPROTEINAS

Las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) se determinaron midiendo el colesterol en el sobrenadandante que resultó de la precipitación selectiva de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) y las de muy baja densidad (C-VLDL) con ácido fosfotúngstico (BOEHRINGER MANNHEIM) (0,5 mmol/l) y $MgCl_2$ (BOEHRINGER MANNHEIM) (25 mmol/l), y posterior centrifugación durante 20 min. a 3000 rpm.

La concentración de C-VLDL y C-LDL se calcularon indirectamente con las siguientes fórmulas (FRIEDWALD y col., 1972; RUSSELL y NAITO, 1986)

$$\text{C-VLDL (mg/dl)} = \frac{\text{Triglicéridos (mg/dl)}}{5}$$

C-LDL = Colesterol total - (C-HDL + C-VLDL)

V.5.3.- APOLIPOPROTEINAS A y B

Se midió su concentración en LF por nefelometría utilizando antisueros Apolipoproteína A y Apolipoproteína B (BECKMAN).

VI.- METODOS ESTADISTICOS

VI.1.- CALCULO DE LOS VALORES MEDIOS Y SU DESVIACION ESTANDAR

Para el cálculo de las medias utilizamos la expresión :

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$$

siendo $\sum_{i=1}^{n} X_i$ la suma de todos los valores encontrandos y n el número de casos observados.

El cálculo de la desviación estándar se realizó mediante la fórmula:

$$D.S. = \sqrt{\frac{1}{n-1}\left(\sum_{i=1}^{n} X_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^{n} x_i\right)^2}{n}\right)}$$

siendo $\sum_{i=1}^{n} x_i^2$ la suma de los cuadrados de los valores hallados.

VI.2.- TEST DE D' AGOSTINO

Se realizó para comprobar si las muestras provienen de una variable normal.

$$\text{Se calcula } D_{exp} = \frac{\Sigma\, i x_i - \left(\frac{n+1}{2}\right) \Sigma\, x_i}{\sqrt{n^3 \left(\Sigma\, x_i^2 - \frac{(\Sigma\, x_i)^2}{n}\right)}}$$

donde x_i son los valores ordenados de menor a mayor y los i sus rangos correspondientes.

VI.3.- ANALISIS DE LA VARIANZA DE UNA VIA

Se utilizó para analizar si "r" muestras proceden de "r" poblaciones con igual media o no. Para que esta técnica sea aplicable debe verificarse que las muestras sean aleatorias (test de las rachas), independientes y obtenidas de "r" poblaciones normales y de varianzas iguales (test de Bartlett). Se calcula:

$s.c.E. = \Sigma (F_i^2/n_i) - R$ siendo F_i la suma de la muestra i y n_i el tamaño de la muestra i.

$R=T^2/N$ siendo $T=\Sigma F_i$ y $N=\Sigma n_i$

$s.c.D. = s.c.T. - s.c.E.$ donde $s.c.T. = (\Sigma x^2)-R$ siendo Σx^2 la suma de los cuadrados de todas las observaciones.

$F_{exp} = S_E / S_D$ siendo $S_E^2 = s.c.E./(r-1)$ y

$S_D^2 = s.c.D./(N-r)$

Las comparaciones por parejas (no fertilizados versus fertilizados menores de tres células; no fertilizados versus fertilizados mayores de tres células;

fertilizados menores de tres células versus fertilizados mayores de tres células) se realizaron según el metodo de Newman - Keuls. Dado que los tamaños de las muestras eran iguales, se aplicó el test de Tukey para analizar las diferencias entre las medias de cada muestra:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}_j|}{\sqrt{\frac{2 \cdot S_D^2}{n}}}$$

Para comparar el grupo de no fecundados con el global de fecundados se realizó un contraste "a posteriori" mediante el cálculo de la t de Scheffe ($\Sigma a_i=0$)

$$t_{exp} = \frac{L}{\sqrt{V(L)}} = \frac{\Sigma a_i \bar{X}_i}{\sqrt{S_D^2 \frac{(\Sigma a_i)^2}{n}}}$$

VI.2.- CORRELACION LINEAL SIMPLE

Lo utilizamos para comprobar si dos variables aleatorias (test de las rachas) cuantitativas x e y obtenidas en n líquidos foliculares estan relacionadas. La fuerza con que las dos variables estan ligadas se

mide mediante el coeficiente de correlaciòn poblacional ρ, el cual se estima por el coeficiente de correlación muestral:

$$r = \frac{(xy)}{\sqrt{(xx)\,(yy)}}$$

Realizando un test de independencia ($H_o \equiv \rho = 0$), comparando una t_{exp} calculada así.

$$t_{exp} = \sqrt{\frac{(n-2)\,r^2}{(1 - r^2)}}$$

contra una t_α (n-2 g.l.).

RESULTADOS

ABREVIATURAS DE LAS TABLAS

n : número de muestras estudiadas.

D.S. : desviación estandar.

t_{exp} : respecto al grupo de no fertilizados.

t'_{exp} : respecto al grupo de < de 4 blastómeras.

* : $p < 0,05$.

** : $p < 0,01$.

*** : $p < 0,001$.

ABREVIATURA DE LAS GRAFICAS

Barras : desviación estandar.

* : $p < 0,05$.

** : $p < 0,01$.

*** : $p < 0,001$.

CONCENTRACION MEDIA DE ESTRADIOL EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

Al estudiar la concentración de Estradiol en el LF se aprecia que sus niveles están significativamente más elevados en el grupo de LF cuyos ovocitos se fertilizaron respecto al de los que no se fertilizaron, no observándose diferencias significativas entre los niveles de Estradiol en LF del grupo de ovocitos fertilizados y divididos en menos de cuatro blastómeras a las 43 horas postinseminación y aquellos divididos en cuatro o más (Tabla I; Gráfica 1).

TABLA I

CONCENTRACION MEDIA DE ESTRADIOL EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

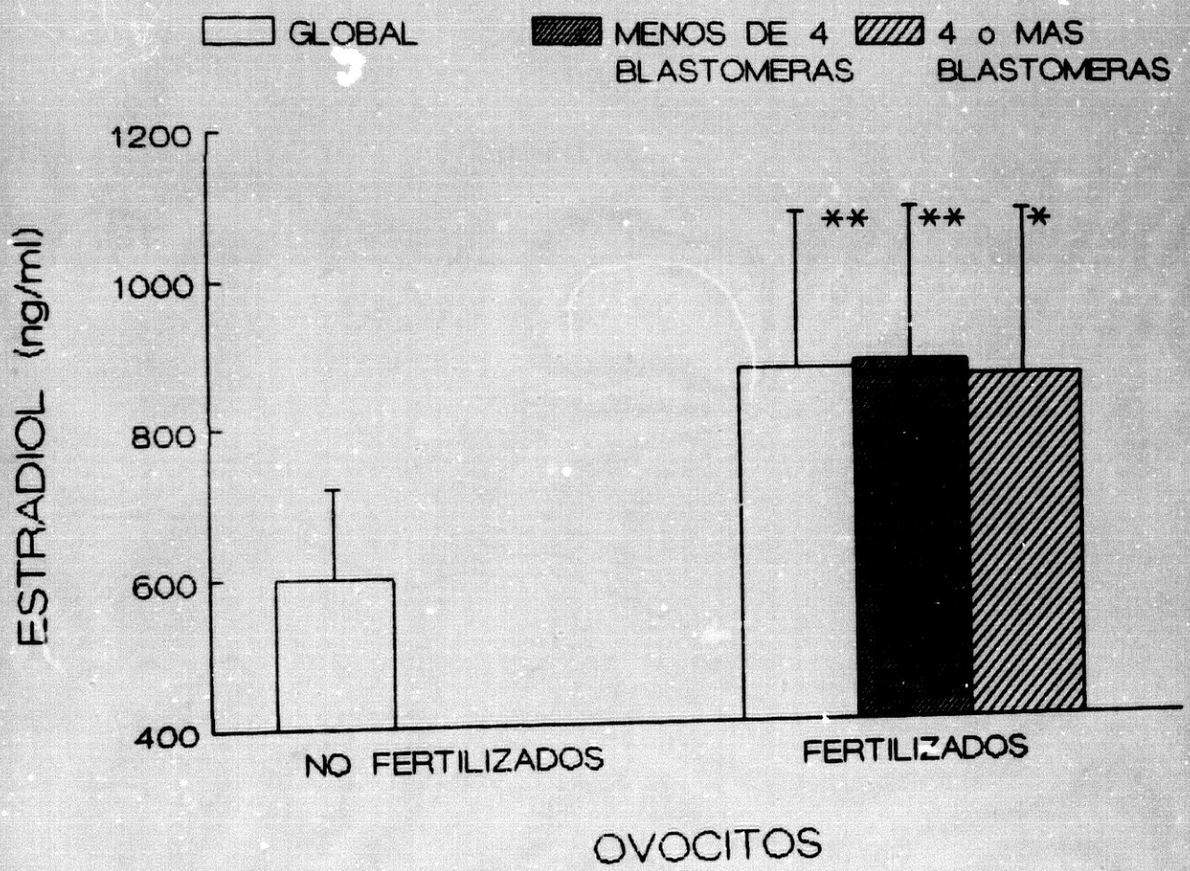
GRUPOS	N	MEDIA ± D.S. (ng/ml)	t_{exp}	t'_{exp}
NO FERTILIZADOS	10	598,9 ± 122,7	---	---
FERTILIZADOS (TOTAL)	20	878,5 ± 213,1	3,75 **	---
< 4 BLASTOMERAS	10	887,9 ± 211,0	3,36 **	---
≥ 4 BLASTOMERAS	10	869,1 ± 226,1	3,15 *	0,20

Ver abreviaturas de tablas.

GRAFICA 1 : Concentración media de Estradiol en LF de ciclos estimulados y su relación con la fertilización in vitro de ovocitos.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 1


GLOBAL
MENOS DE 4 BLASTOMERAS
4 o MAS BLASTOMERAS
1200
1000
800
600
400
ESTRADIOL (ng/ml)
**
**
*
NO FERTILIZADOS
FERTILIZADOS
OVOCITOS

CONCENTRACION MEDIA DE PROGESTERONA EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

Se encuentran niveles de Progesterona significativamente más altos en los LF asociados a ovocitos que se fertilizaron al compararlos con los que no se fertilizaron. Sin embargo no existen diferencias significativas en la concentración de Progesterona en LF al considerar el número de blastómeras en que se han dividido los ovocitos fertilizados (Tabla II; Gráfica 2).

Existe una correlación significativa entre los niveles de Progesterona y Estradiol en LF (Gráfica 3).

TABLA II

CONCENTRACION MEDIA DE PROGESTERONA EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

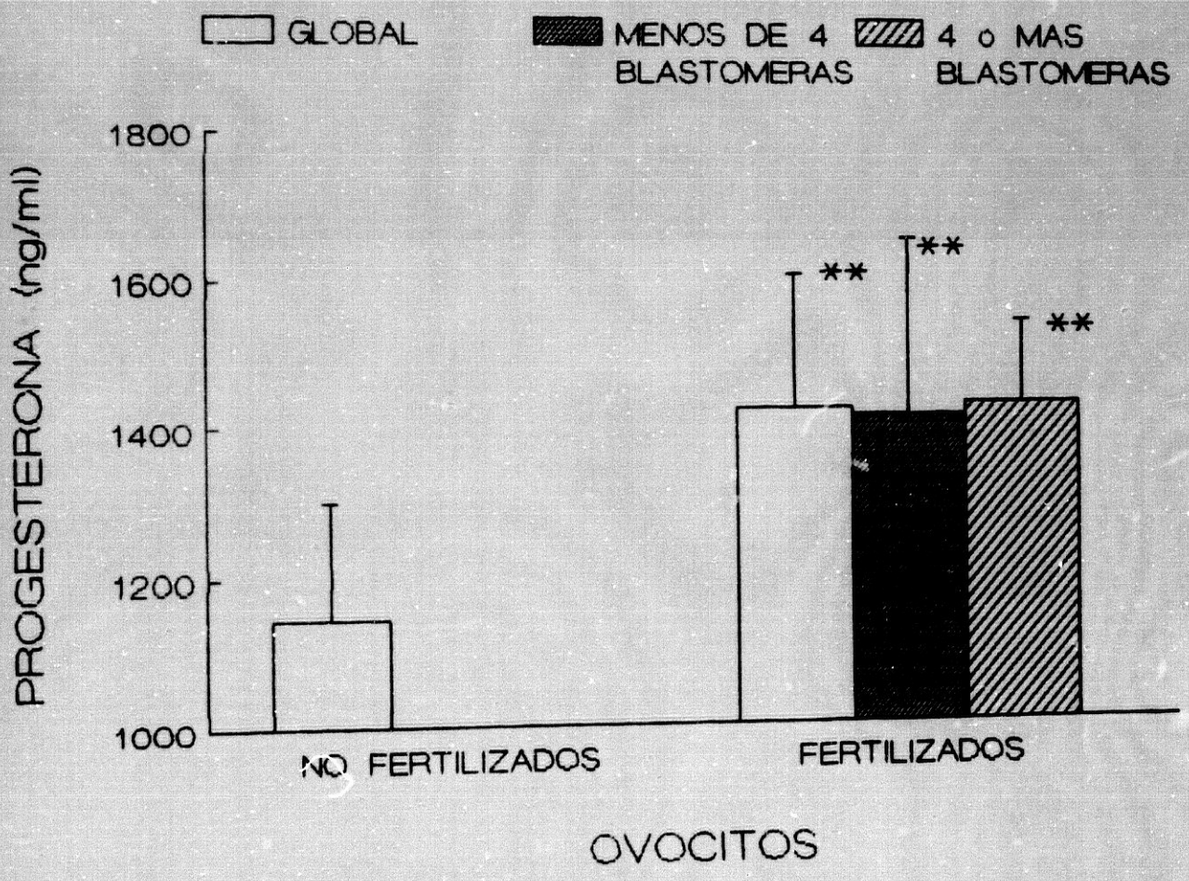
GRUPOS	N	MEDIA ± D.S (ng/ml)	t_{exp}	t'_{exp}
NO FERTILIZADOS	10	1144,0 ± 157,9	---	---
FERTILIZADOS (TOTAL)	20	1424,4 ± 183,9	4,04 **	---
< 4 BLASTOMERAS	10	1415,0 ± 242,2	3,38 **	---
≥ 4 BLASTOMERAS	10	1433,9 ± 112,1	3,60 **	0,22

Ver abreviaturas de tablas.

GRAFICA 2 : Concentración media de Progesterona en LF de ciclos estimulados y su relación con la fertilización in vitro de ovocitos.

(Ver abreviaturas de gráficas).

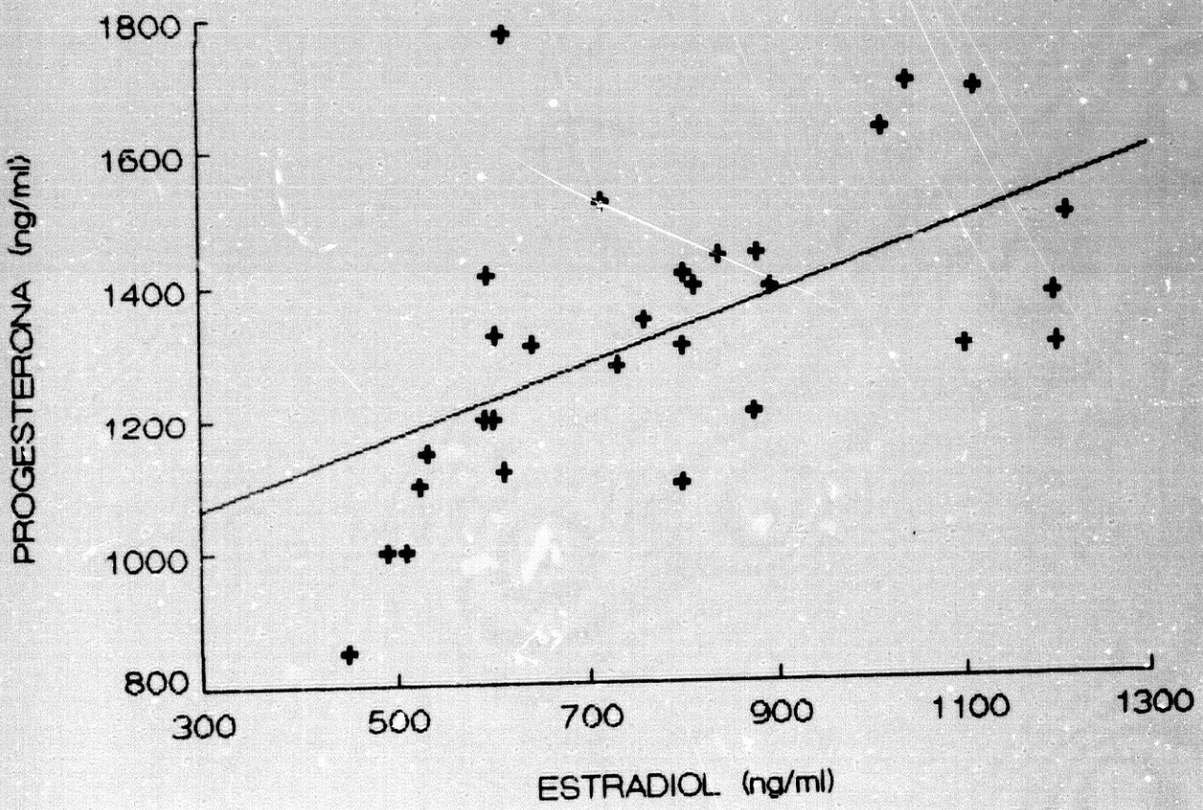
GRAFICA 2


GLOBAL
MENOS DE 4 BLASTOMERAS
4 o MAS BLASTOMERAS
PROGESTERONA (ng/ml)
1800
1600
1400
1200
1000
**
**
**
NO FERTILIZADOS
FERTILIZADOS
OVOCITOS

GRAFICA 3 : Correlación entre los niveles de Progesterona y Estradiol en líquido folicular.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 3



r=0,570

t_{exp}=3,575

p<0,001

COCIENTE ESTRADIOL/PROGESTERONA EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

En la tabla III y en la gráfica 4 se observa que el cociente Estradiol/Progesterona en LF es ligeramente superior en el grupo de los LF cuyos ovocitos se fertilizaron respecto al grupo de los que no se fertilizaron, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Tampoco se encuentran diferencias significativas entre los LF al estudiar la velocidad de división de los ovocitos fertilizados.

Existe una correlación significativa entre el cociente de Estradiol/Progesterona y la concentración de Estradiol en el LF (Gráfica 5), no observandose correlación significativa entre este cociente y los niveles de Progesterona (r=0,069).

TABLA III

COCIENTE ESTRADIOL/PROGESTERONA EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

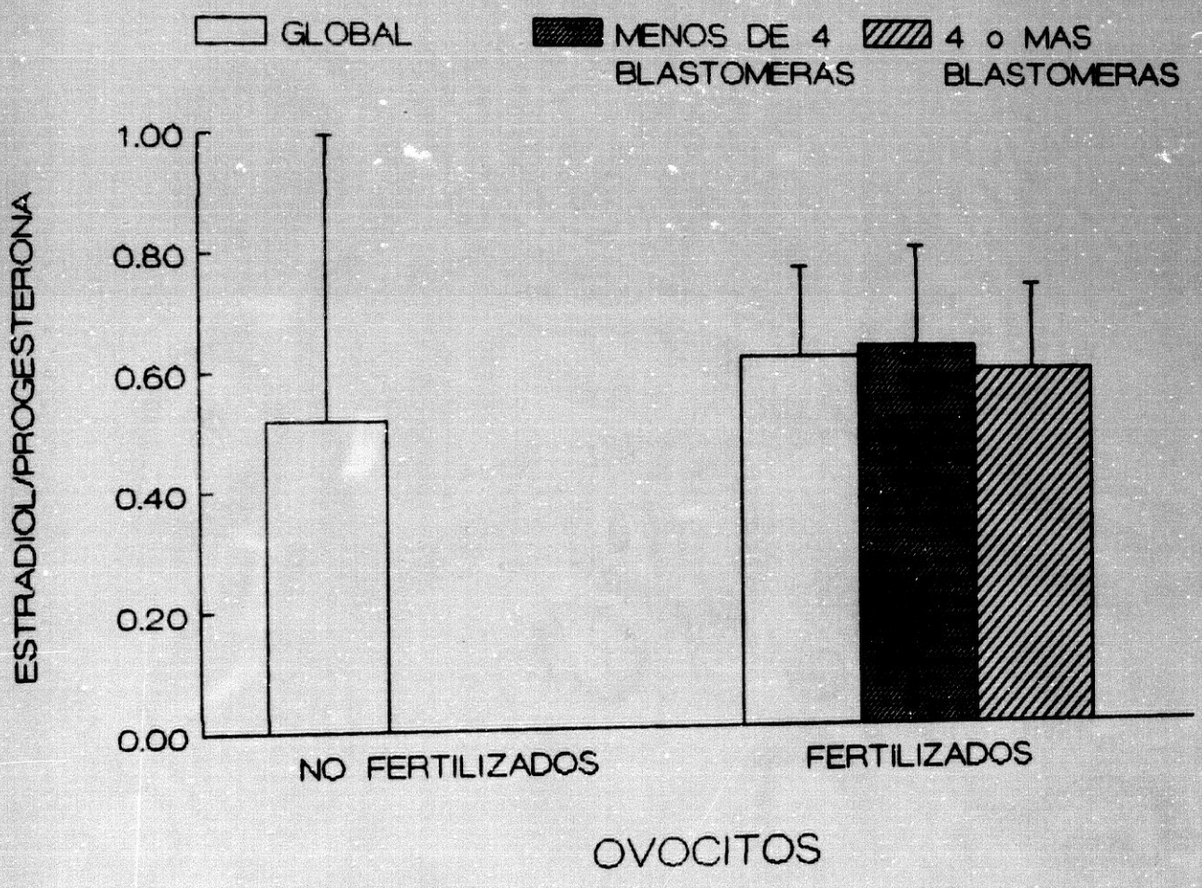
GRUPOS	N	MEDIA ± D.S.	t_{exp}	t'_{exp}
NO FERTILIZADOS	10	0,52 ± 0,48	---	---
FERTILIZADOS (TOTAL)	20	0,62 ± 0,15	2,04	---
< 4 BLASTOMERAS	10	0,64 ± 0,17	2,09	---
≥ 4 BLASTOMERAS	10	0,60 ± 0,14	1,44	0,65

Ver abreviaturas de tablas.

GRAFICA 4 : Cociente Estradiol/Progesterona en LF de ciclos estimulados y su relación con la fertilización in vitro de ovocitos.

(Ver abreviaturas de gráficas).

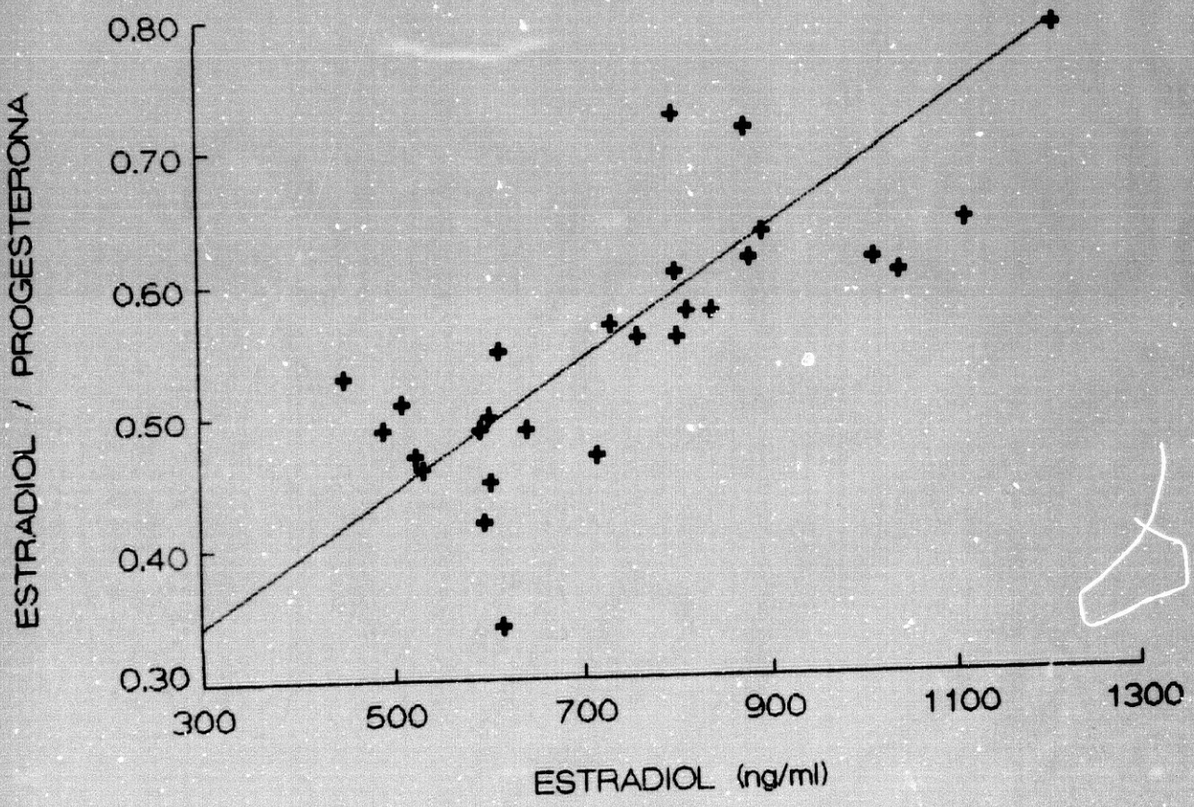
GRAFICA 4


GLOBAL
MENOS DE 4 BLASTOMERAS
4 o MAS BLASTOMERAS
ESTRADIOL/PROGESTERONA
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
NO FERTILIZADOS
FERTILIZADOS
OVOCITOS

GRAFICA 5 : Correlación entre el cociente Estradiol/Progesterona y los niveles de Estradiol en líquido folicular.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 5



$r = 0,852$

$t_{exp} = 8,612$

$p < 0,001$

CONCENTRACION MEDIA DE FSH EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

Cuando se compararon las concentraciones medias de FSH en los LF de los ovocitos fertilizados con las de los no fertilizados, no se han encontrado diferencias estadísticas significativas. Tampoco fueron estadísticamente significativas las diferencias de dichas concentraciones al analizar el número de divisiones de los ovocitos fertilizados a las 43 horas postinseminación (Tabla IV; Gráfica 6).

No observamos correlación entre los niveles de FSH en LF y los de Estradiol (r=-0,050), Progesterona (r=-0,058), y cociente Estradiol / Progesterona (r=-0,045).

TABLA IV

CONCENTRACION MEDIA DE FSH EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

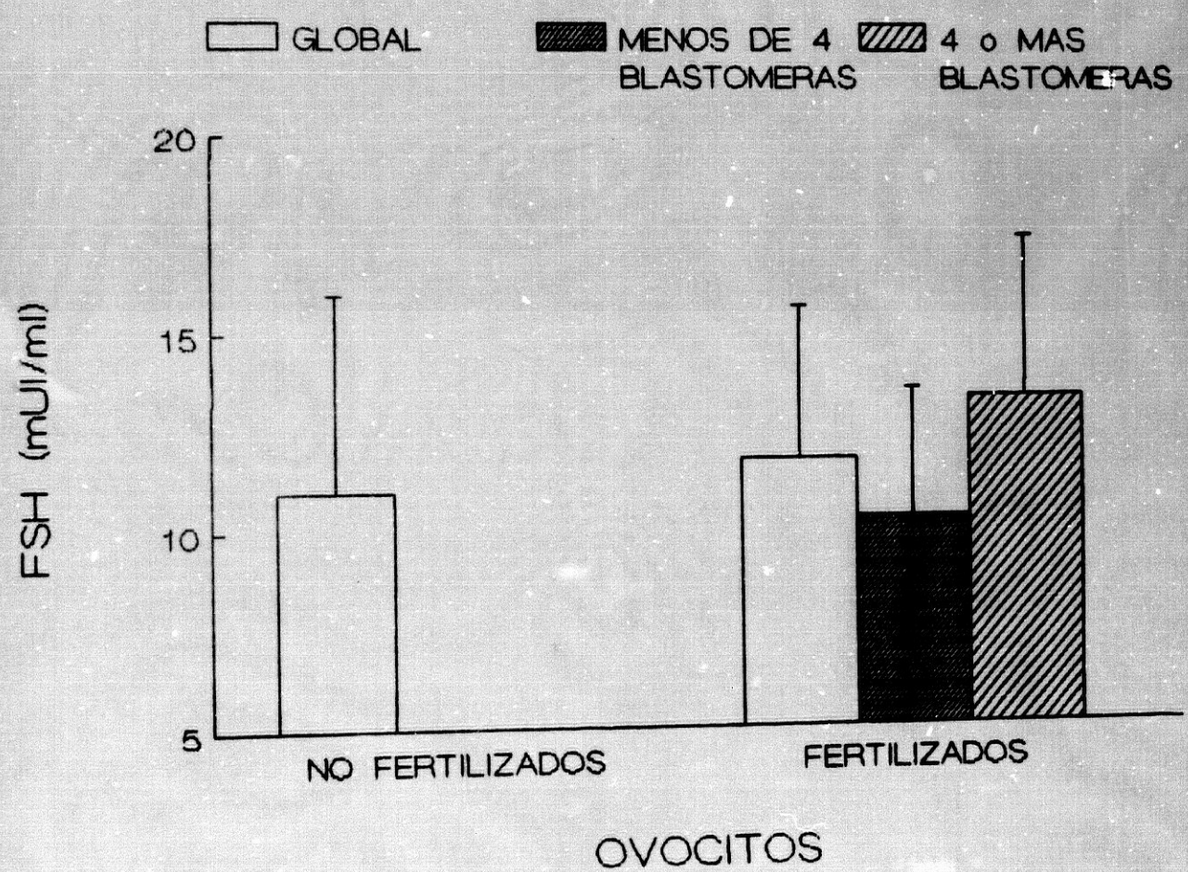
GRUPOS	N	MEDIA ± D.S. (mUI/ml)	t_{exp}	t'_{exp}
NO FERTILIZADOS	10	11,0 ± 5,0	---	---
FERTILIZADOS (TOTAL)	20	11,8 ± 3,9	0,52	---
< 4 BLASTOMERAS	10	10,3 ± 3,3	0,37	---
≥ 4 BLASTOMERAS	10	13,4 ± 4,1	1,28	1,65

Ver abreviaturas de tablas.

GRAFICA 6 : Concentración media de FSH en LF de ciclos estimulados y su relación con la fertilización in vitro de ovocitos.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 6


GLOBAL
MENOS DE 4 BLASTOMERAS
4 o MAS BLASTOMERAS
20
15
10
5
FSH (mUI/ml)
NO FERTILIZADOS
FERTILIZADOS
OVOCITOS

CONCENTRACION MEDIA DE LH EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

Se ha detectado una concentración de LH significativamente más baja en el LF de los ovocitos que no se fertilizaron al compararla con la de los LF de los que se fertilizaron. Sin embargo no se han encontrado diferencias en la concentración de esta hormona en LF al estudiar la velocidad de división de los ovocitos correspondientes (Tabla V; Gráfica 7).

Los niveles de LH en LF se correlacionan significativamente con la concentración de Estradiol (Gráfica 8) y Progesterona (Gráfica 9).

TABLA V

CONCENTRACION MEDIA DE LH EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

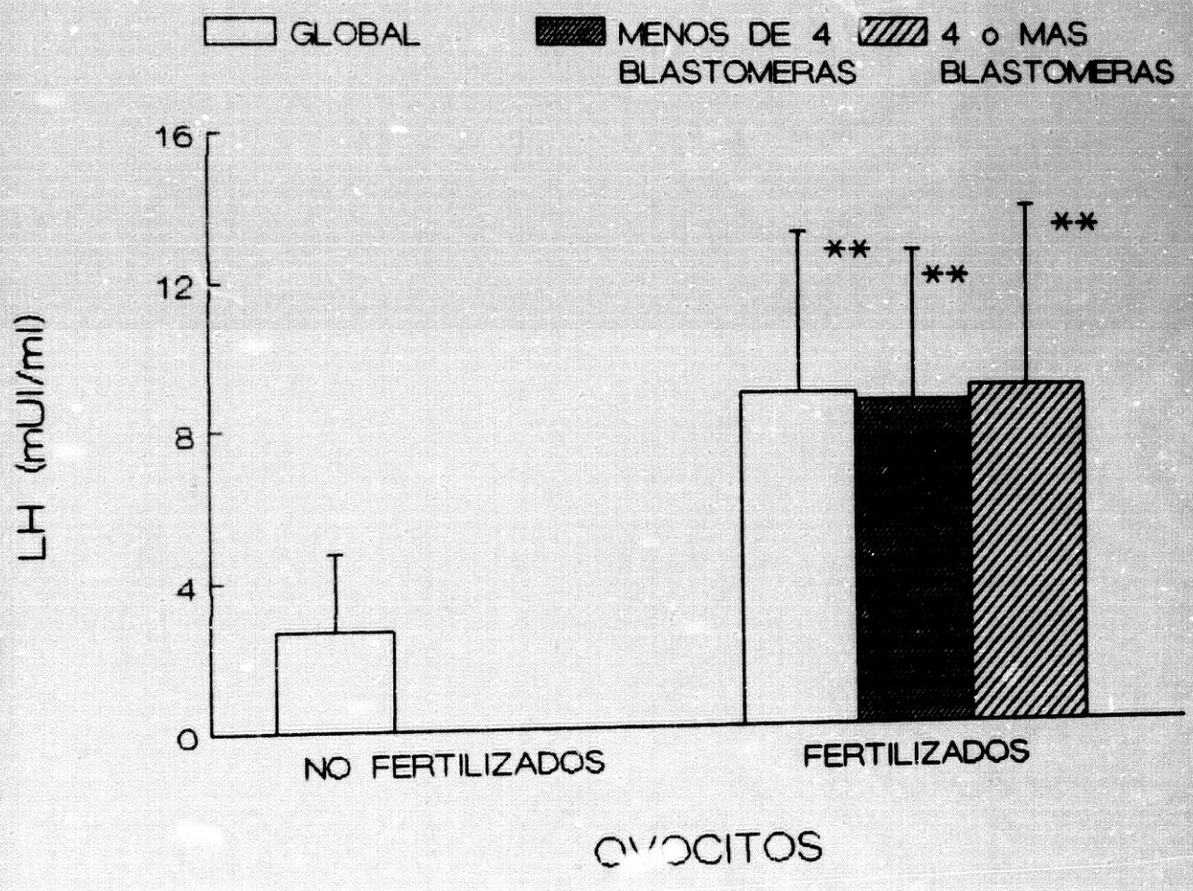
GRUPOS	N	MEDIA ± D.S. (mUI/ml)	t_{exp}	t'_{exp}
NO FERTILIZADOS	10	2,7 ± 2,1	---	---
FERTILIZADOS (TOTAL)	20	9,0 ± 4,4	4,17 **	---
< 4 BLASTOMERAS	10	8,8 ± 4,1	3,50 **	---
≥ 4 BLASTOMERAS	10	9,2 ± 4,9	3,73 **	0,23

Ver abreviaturas de tablas.

GRAFICA 7 : Concentración media de LH en LF de ciclos estimulados y su relación con la fertilización in vitro de ovocitos.

(Ver abreviaturas de gráficas).

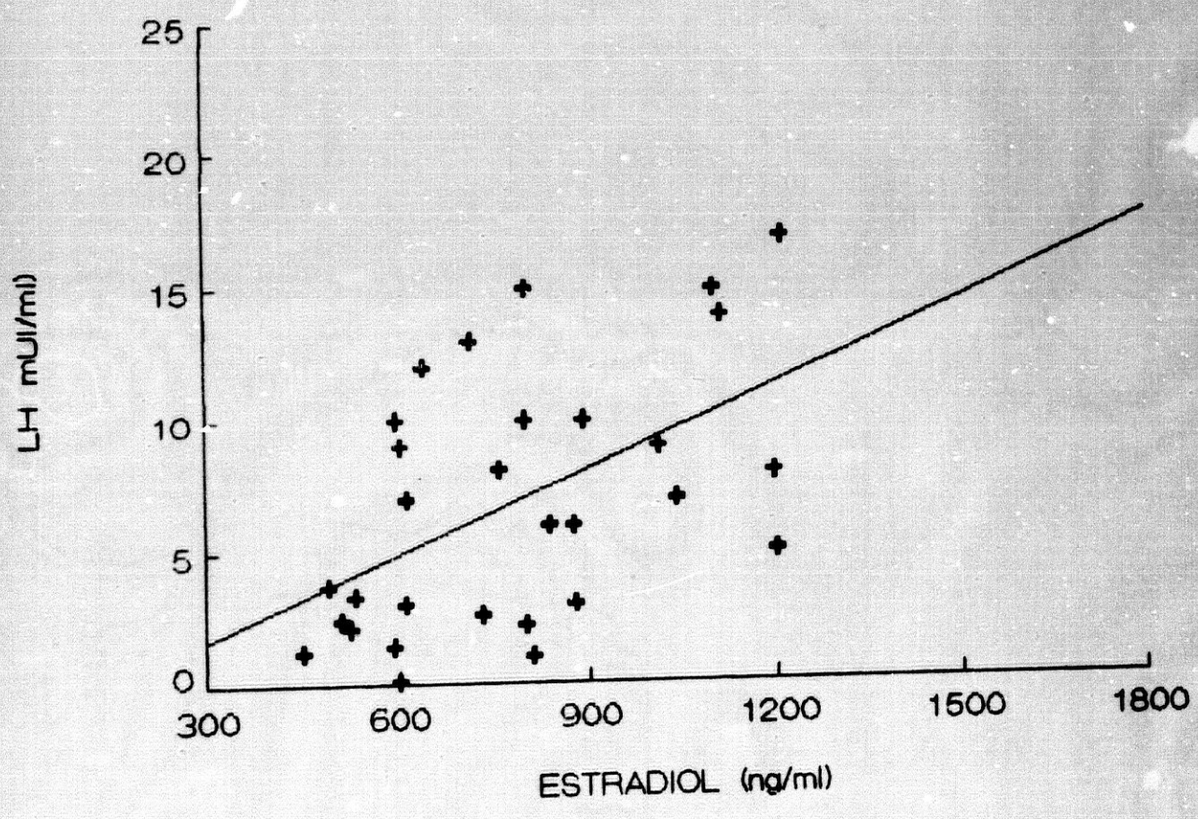
GRAFICA 7


GLOBAL
MENOS DE 4 BLASTOMERAS
4 o MAS BLASTOMERAS
LH (mUI/ml)
16
12
8
4
0
**
**
**
NO FERTILIZADOS
FERTILIZADOS
OVOCITOS

GRAFICA 8 : Correlación entre los niveles de LH y Estradiol en líquido folicular.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 8



$r = 0,511$

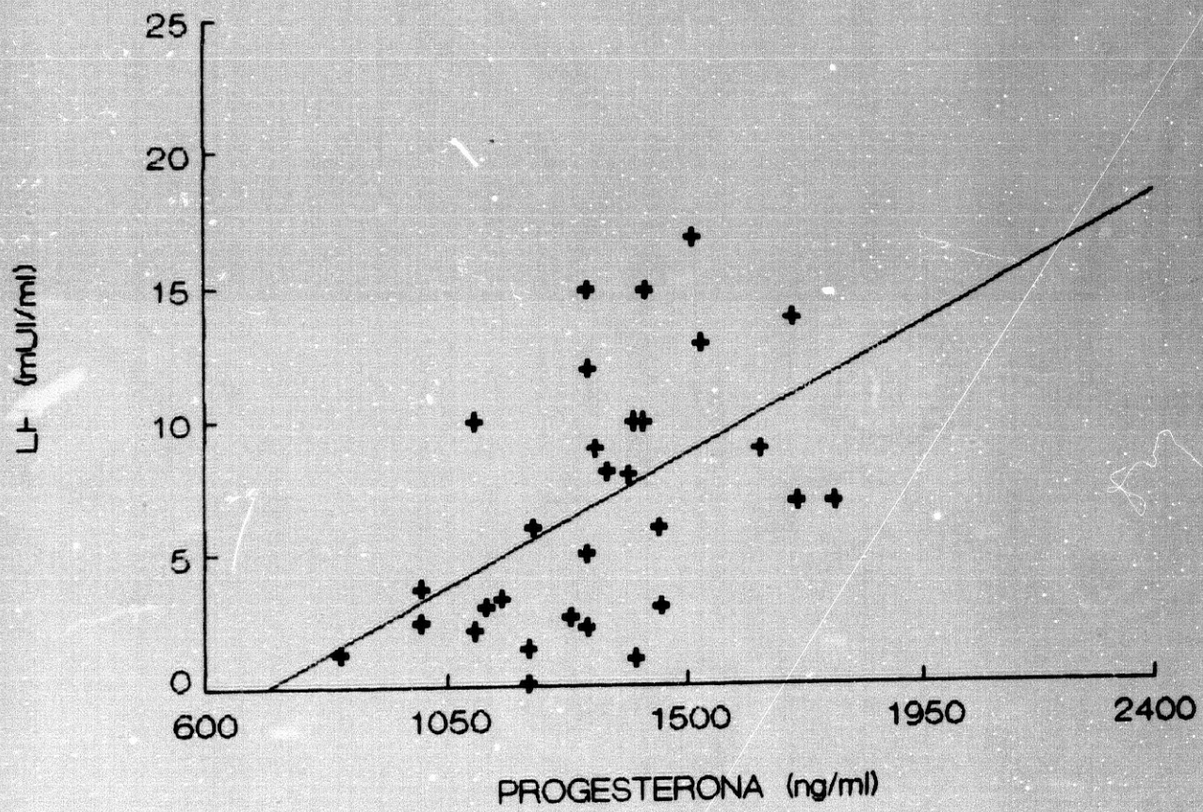
$t_{exp} = 3,141$

$p < 0,01$

GRAFICA 9 : Correlación entre los niveles de LH y Progesterona en líquido folicular.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 9



$r = 0,509$

$t_{exp} = 3,129$

$p < 0,01$

CONCENTRACION MEDIA DE PROLACTINA (PRL) EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

Como se aprecia en la tabla VI y en la gráfica 10 la concentración media de PRL es ligeramente más baja en los LF cuyos ovocitos se fertilizaron respecto a la de los que no se fertilizaron, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Tampoco los niveles de PRL muestran diferencias significativas en los LF entre el grupo de ovocitos fecundados y divididos en menos de cuatro blastómeras y los divididos en cuatro o más células a las 43 horas postinseminación.

No hemos encontrado correlación significativa entre los niveles de PRL en LF y los de Estradiol (r=0,013), Progesterona (r=-0,164), cociente Estradiol/Progesterona (r=0,011), FSH (r=0,140) y LH (0,039).

TABLA VI

CONCENTRACION MEDIA DE PROLACTINA EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS Y SU RELACION CON LA FERTILIZACION IN VITRO DE OVOCITOS.

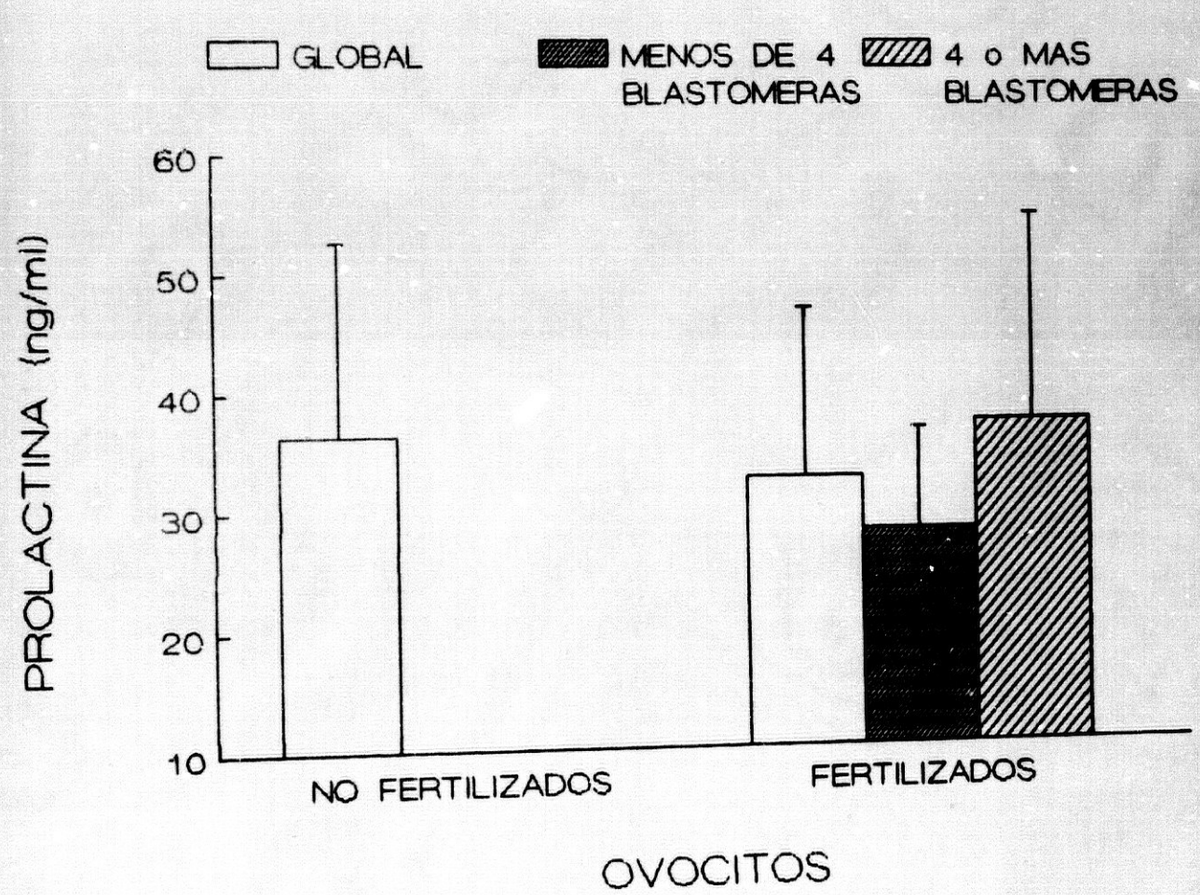
GRUPOS	N	MEDIA ± D.S. (ng/ml)	t_{exp}	t'_{exp}
NO FERTILIZADOS	10	36,4 ± 16,3	---	---
FERTILIZADOS (TOTAL)	20	32,8 ± 14,2	0,63	---
< 4 BLASTOMERAS	10	28,2 ± 8,6	1,25	---
≥ 4 BLASTOMERAS	10	37,5 ± 17,4	0,18	1,42

Ver abreviaturas de tablas.

GRAFICA 10 : Concentración media de Prolactina en LF de ciclos estimulados y su relación con la fertilización in vitro de ovocitos.

(Ver abreviaturas de gráficas).

GRAFICA 10


GLOBAL
MENOS DE 4 BLASTOMERAS
4 o MAS BLASTOMERAS
PROLACTINA (ng/ml)
60
50
40
30
20
10
NO FERTILIZADOS
FERTILIZADOS
OVOCITOS