

17204
4
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA

FALLA DE ORIGEN

"EVIDENCIA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL LIQUIDO FOLICULAR: ESTUDIO EVALUATORIO Y ANALITICO DE MUESTRAS OBTENIDAS EN UN PROGRAMA DE REPRODUCCION ASISTIDA"

[Signature]
DR. ALBERTO ALVARADO DURAN
PROFESOR TITULAR

[Signature]
DR. EDUARDO CASTELLANO MORALES
COORDINADOR GENERAL DE ASISTENCIA
REPRODUCTIVA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO EN LA SUBESPECIALIDAD
EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION
P R E S E N T A
DR. ALBERTO VIELMA VALDEZ

Tutor: Dr. Alberto Alvarado Durán



INPer

MEXICO, D. F.

1995

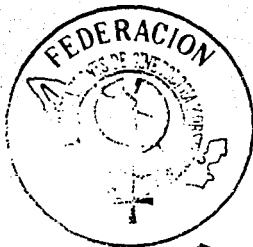


UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



LA FEDERACION MEXICANA DE ASOCIACIONES
DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA, A.C.

otorga

AL DR. ALBERTO VIELMA VALDEZ

DIPLOMA

por haber obtenido

SEGUNDO LUGAR

en el área de.

INVESTIGACION CLINICA

con su trabajo

"Evidencia de actividad antimicrobiana del líquido folicular: Estudio evaluatorio y
analítico de muestras obtenidas en un programa de reproducción asistida"

Noviembre 10 de 1994


Dr. José Roberto Ahued Ahued

PRESIDENTE


Dr. Elias S. Canales Pérez

SECRETARIO


Dr. Victoriano Ilica Rodríguez

TESORERO

A MIS PADRES:

**Los autores de mis días,
mi amor escrito sin límites.**

**A MIS HERMANOS,
y con quienes comparten su vida.**

**CON ESPECIAL CARIÑO, A
MI HERMANO JUAN CARLOS:
Quien me enseñó que la vida
tiene muchos valores.**

AL DR. ALBERTO ALVARADO DURAN.

**Preparación, interés y constancia,
gracias por ayudarme a entenderlo.**

DR. ALBERTO KABLY AMBE.

Ejemplo de dedicación y esfuerzo.

DR. HECTOR HUGO BUSTOS LOPEZ.

La mano amiga.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
EL LIQUIDO FOLICULAR	4
ASPECTOS Y PROPIEDADES DEL LIQUIDO FOLICULAR	6
Tamaño y estructura de los folículos	6
Propiedades físicas del LF	7
COMPONENTES NO HORMONALES DEL LF	9
Componentes orgánicos	9
Carbohidratos, Proteoglicanos, Lípidos	10
Proteínas	14
Péptidos intraováricos y su papel potencial	15
Factor de crecimiento epidermal	16
Factor de crecimiento de fibroblastos básico	17
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	18
Factor de crecimiento de transformación beta	18
Factor de crecimiento semejantes a insulina	18

Citocinas y la función ovárica	23
Inhibina, Activina y Folistatina	26
Sistema Renina-Angiotensina	30
Endotelinas	31
Enzimas	32
Eicosanoides	32
GONADOTROPINAS Y HORMONAS ESTEROIDES EN EL	
LIQUIDO FOLICULAR	34
Gonadotropinas	34
Biosíntesis de esteroides	36
Biosíntesis de estrógenos	37
Biosíntesis de progestinas	39
Biosíntesis de andrógenos	40
LIQUIDO FOLICULAR Y EL CRECIMIENTO, MADURACION Y	
RUPTURA DEL FOLICULO	42
Crecimiento del folículo y maduración del ovocito	42
Luteinización del folículo	44
La membrana folicular como barrera	45
Ruptura del folículo	46

EL LIQUIDO FOLICULAR, EL OVIDUCTO Y EL

ESPERMATOZOIDE	47
El transporte del ovocito a la ampula	47
Capacitación del espermatozoide	48
INMUNOLOGIA DEL LIQUIDO FOLICULAR	52
OBJETIVOS	55
MATERIAL Y METODOS	56
RESULTADOS	61
DISCUSION	63
BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUCCION

El estudio del líquido folicular (LF) ha sido objeto de estudio por parte de biólogos, veterinarios y médicos. Está compuesto parcialmente de secreciones del folículo y otra parte de exudado del plasma. La presencia de este líquido en el humano y en muchas otras especies testifica su importancia potencial en la fisiología ovárica, incluyendo esteroidogénesis, crecimiento del folículo y ovulación, maduración del ovocito, quimiotaxis de los espermatozoides y transporte a través del oviducto.

En los avances en el conocimiento de las propiedades físicas, químicas y/o fisiológicas del LF, se aprovecha como medio para la capacitación de espermatozoides y en la transferencia intratubaria de gametos (GIFT), además de su uso como medio de cultivo para los procedimientos de fertilización in vitro. Potencialmente puede encontrarse otros amplios usos en reproducción asistida a la luz de mayores intentos a imitar el medio ambiente in-vivo de la fertilización e implantación.

Dada la heterogeneidad de los componentes y propiedades del LF, se le confieren características similares en alguna forma a la de otros líquidos del organismo (plasma sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico), por lo que diferentes propiedades de LF necesitan ser valoradas. Aunque existen reportes bibliográficos donde se describen aspectos inmunológicos como presencia de complemento,

macrófagos, interleucinas, propiedades inmunosupresoras, etc., no existen reportes sobre sus características antimicrobianas de ésta sustancia.

El presente estudio fue iniciado por las observaciones en función de pacientes sometidas a captura ovular, siendo ésta para fertilización in-vitro o para transferencia intratubaria de gametos. El ovario queda con una superficie cruenta y muchas veces con sangrado residual, escaso, pero persistente el cual pudiese ser un medio de cultivo en una zona quirúrgicamente agredida y a la cual no se le realiza procedimiento hemostático o de sutura alguno. A pesar de lo anterior, es decir contar con un lecho fácilmente identificable como sitio de altas posibilidades de colonización e infección, la presencia de éste último es prácticamente nula.

Sin embargo, en los más de 5 años de funcionamiento de la Clínica de Reproducción Asistida del Instituto Nacional de Perinatología, no se ha tenido un solo caso de infección posterior al procedimiento de captura ovular, por lo que se puede suponer que haya algún factor que inhiba el desarrollo bacteriano.

En los reportes bibliográficos sólo existen informes del conocimiento de relativa resistencia del ovario a la colonización microbiana en pacientes con enfermedad pélvica inflamatoria, lo que fue motivo de atención y de llevar a cabo un análisis cuyo propósito es en miras a evaluar una actividad antimicrobiana

(bacteriostática y bactericida) del líquido folicular in-vitro obtenido de pacientes a quienes se les aspiró el ovocito para ser sometidas a FIV-TE o GIFT.

EL LIQUIDO FOLICULAR

El ovario, un tejido siempre cambiante, es una estructura multicompartamental con diferentes y variables propiedades biológicas. La transformación del folículo ovárico hacia un cuerpo lúteo fue primero descrito en 1672 por Renger de Graaf. Desde ese tiempo, el folículo ovárico ha sido claramente mostrado a constituir la unidad funcional fundamental del ovario (1).

El folículo en crecimiento sufre una transformación de una masa sólida de células incluyendo el ovocito a un folículo lleno de líquido conteniendo un antro localizado centralmente hacia el cual se proyecta una columna de células, el cumulus ooforus, continuándose con la membrana granulosa. El ovocito, rodeado por la corona radiata, se encuentra unido al cumulus ooforus tomando una posición lateralizada dentro del antro. Inicialmente aparece, entre las células de la granulosa multiplicándose, áreas muy pequeñas llenas de líquido, las cuales serán confluentes y darán origen a un antro lleno de líquido único. Esta configuración folicular es característica de muchos, pero no de todos los mamíferos (2).

El líquido folicular es compuesto parcialmente de secreciones del folículo y parcialmente de exudado del plasma. Su composición refleja cambios en los procesos secretorios del estado de la granulosa y teca interna o alteraciones en los componentes del plasma, debido a procesos fisiológicos y patológicos. La presencia de líquido

folicular en muchas especies testifica su importancia potencial en la fisiología ovárica, incluyendo esteroidogénesis, crecimiento del folículo y ovulación, maduración del ovocito y su transporte al oviducto (3).

La fuente del líquido en los folículos de Graaf fue discutido ampliamente en tempranos debates, algunas autoridades manteniendo que éste, es producido dentro del folículo mientras otras afirmando a ser un transudado del plasma. Tal debate es ahora espurio ya que los múltiples componentes del líquido ciertamente se originan en ambas fuentes. Las proteínas plasmáticas por ejemplo, son encontradas en el líquido folicular, siendo improbables a ser sintetizadas in situ. De otra manera, las altas concentraciones de esteroides y de proteoglicanos al menos ciertamente reflejan la actividad sintética de las células foliculares (2, 3, 4, 5).

ASPECTO Y PROPIEDADES FÍSICAS DEL LIQUIDO FOLICULAR

TAMAÑO Y ESTRUCTURA DE LOS FOLICULOS: El tamaño de un folículo Graaf que completa su crecimiento varía ampliamente entre las especies, de unos pocos milímetros en el ratón a 5 cms en yeguas (3). El líquido folicular, el cual constituye el microambiente que nutre al ovocito, es separado de la circulación sanguínea por dos estratos tisulares. Las células de la granulosa están situadas y separadas del estroma que las rodea sobre una membrana referida como la lámina basal. Estas células están desprovistas de ingresos vasculares (al menos hasta algunas horas antes de la ruptura folicular). La naturaleza avascular del compartimiento de células de granulosa necesita contacto entre las células vecinas, por lo que lo realiza por medio de uniones intercelulares de hendidura, resultando en su acoplamiento eléctrico un sincitio funcional e integrado (1, 4).

Generalmente se presume que esas uniones especializadas puede ser importantes en el intercambio metabólico y en el transporte de pequeñas moléculas entre las células de la granulosa vecinas; además cuentan con extensiones citoplásmicas que forman uniones parecidas a las uniones de hendidura con la membrana del ovocito (6, 7).

Las teca interna se sitúa de la lámina basal y, a diferencia de la granulosa es vascularizada. La integridad del folículo al completar el crecimiento es indudablemente

determinado por las propiedades de esos tres estratos. El contenido del foliculo son así separados de la circulación por barreras fisiológicas y celulares a través de su desarrollo.

Las terminaciones nerviosas en el fólculo sólo incluyen a la teca, en asociación con fibras musculares. Colectivamente, observaciones sobre el desarrollo y crecimiento folicular temprano y tardío dependen no sólo de una adecuada secreción de gonadotropinas pituitarias sino también de secreción de hormonas esteroides sexuales ováricas en respuesta a la estimulación gonadotrópica corregulando o mediando ésta acción, diversos péptidos intraováricos, factores de crecimiento, citocinas, sus receptores y sus proteínas de unión (1, 3, 8, 9, 10).

PROPIEDADES FISICAS DEL LIQUIDO FOLICULAR: El líquido folicular (LF) en los fólculos preovulatorios es muy similar al plasma. Su color es pajizo, aunque éste puede a un tiempo aparecer amarillo, tiene una viscosidad variable, una osmolaridad y un contenido de electrolitos, con menores variaciones, al menos igual a la del plasma (Cuadro 1) (2, 3, 11).

El contenido de gas del líquido folicular humano ha sido comparada con la del plasma con diferentes resultados, el PO_2 es altamente variable y no se correlaciona con la histología folicular, pero el PCO_2 es correlacionado aproximadamente con un pH de 7.3 (2,3).

Fraser y col. notaron que el PO_2 es alto en sangre venosa ovárica más que en sangre periférica en mujeres y sugiere que pueden existir derivaciones arteriovenosas que pueden contar para los altos niveles de PO_2 del LF puede ser más bajo que la PO_2 de la sangre venosa y periférica. Desafortunadamente esos estudios no son comparables debido que algunos autores examinaron el LF mientras Fraser estudió sólo sangre venosa ovárica y sangre venosa periférica. En el ovario de la rata ninguna evidencia de derivaciones arteriovenosas fue encontrada en estudios basados sobre perfusión in situ con microsferas (2, 11).

Aunque Knobil y Neill no pudieron registrar una diferencia de potencial a través de la pared folicular en ratas y conejos, un pequeño potencial positivo ($+ 1.2 \pm 0.3$ mV) ha sido reportado a través de la pared del folículo de ratón, con un incremento de $+ 3.8 \pm 0.8$ mV inmediatamente antes de la ovulación. Esos efectos se ha visto modulados con la aplicación de pentobarbital sódico, ouavaina induciendo un potencial positivo, mientras que PGE_1 y $PGF_{2\alpha}$ causa potenciales negativos; los cambios involucrados son extremadamente pequeños, y sus medidas se dificultan a interpretar (3, 12).

COMPONENTES NO HORMONALES DEL LIQUIDO FOLICULAR

COMPONENTES INORGANICOS: Los niveles de varios elementos en el LF son cercanos a éstos encontrados en el suero. Aunque algunas diferencias han sido notadas, su significancia permanece desconocida, ello puede reflejar debido a los métodos de la muestra o la fuente tisular. Dos iones de considerable interés son Na^{++} y K^{+} , por concentraciones determinarán la presión osmótica del líquido. En la experiencia de Knobil (cuadro 1) de líquidos aspirados de folículos preovulatorios humanos, los niveles de los dos iones fueron similares aunque más variables que esos en suero, y la misma conclusión fue obtenida de análisis de líquidos de folículos desarrollados en excisiones ováricas (3).

En otros estudios en vacas, más potasio y, a menos extensión, el sodio fueron encontrados en el LF más que en el suero (Cuadro 2) especialmente en el líquido de los folículos en crecimiento.

Magnesio, cloro, calcio, zinc, cobre, fosfato inorgánico han sido medidos en el LF de vacas y los valores fueron en general muy cercanos similares a esos del plasma.

Los gases en el LF humano fueron estimados por Shaigi y cols., usando un sistema de microelectrodo. La tensión de oxígeno fue variable con promedio de 54 mmHg. La variabilidad entre los folículos de pacientes individuales fue como entre los

pacientes, indicando que los folículos determinan por sí mismos las variaciones en la tensión de oxígeno. Los valores para CO₂ fueron menos variables, y fueron determinados parcialmente por la actividad del folículo; a un promedio de 35 mmHg, siendo similares a los valores normales aceptados para el suero (13).

Pequeñas moléculas en el plasma serán rápidamente equilibradas con el LF. El agua tritiada alcanzará niveles de equilibrio en el LF humano dentro de 15 y 25 minutos después de una inyección intravenosa. Los elementos marcados tales como I¹³¹ y otros componentes estuvieron en equilibrio dentro de 4 horas y fueron retenidos por largo tiempo en el LF. Los componentes tales como el azul de Evans rápidamente entran en el folículo, especialmente en éstos cercanos a la ovulación, con resultados notables diferenciables entre éstos y los folículos pequeños dentro de unos pocos minutos (3, 13).

CARBOHIDRATOS, PROTEOGLICANOS, LIPIDOS: Los análisis bioquímicos del LF de bovinos revelan la glucosa a una concentración de 40 mg% comprendiendo cerca de las tres cuartas partes del total de carbohidratos. Otros componentes como Fructuosa están presentes en menor cantidad; el ácido láctico y el colesterol fueron también identificados en el LF (Cuadro 3). Los niveles de hexosas unidos a proteínas y de fucosa fueron bajas en LF de bovinos más que el plasma, encontrándose la mayoría en el líquido de folículos pequeños en vacas y yeguas. Los

niveles de glucosa en LF de bovinos aumenta durante el pro-oestrus. La ribulosa ha sido identificada en el LF humano (3).

Debido a que el LF es compuesto parcialmente de exudado del plasma, uno puede esperar que diversas sustancias de éste último estén presentes en el LF humano por lo que se establece que provee nutrimento al ovocito al facilitar transporte de plasma contribuyendo a su estado nutricional el cual es importante para su maduración y subsecuente fertilización y embriogénesis. Steeger-Theunissen determinó la concentración de methionina, homocisteína y vitaminas comparadas con los valores sanguíneos (Cuadro 4) (14).

La presencia de éstos componentes en el LF puede tener una significancia, ya que al ser una extensión de los valores del plasma, una alteración del metabolismo puede verse reflejado en los componentes intrafoliculares, lo que en teoría una alteración con respecto a las concentraciones de homocisteína y methionina puede involucrar una maduración anormal del ovocito, en su fertilización o desarrollo embrionario temprano. No obstante altas concentraciones de homocisteína y bajos valores de methionina intrafoliculares expuestas al ovocito puede contribuir a pérdidas subsecuentes o desarrollo de defectos del tubo neural en embriones post-implantación. Recientemente también se demostró in vitro con embriones de rata la embriotoxicidad de L-homocisteína al reducir el índice mitótico del epitelio neural del romboencéfalo. Esta toxicidad pudo ser reducida por la adición de 5-metiltetrahidrofolato y de

vitamina B₁₂ en particular. En vista de los hallazgos anteriores, la presencia de folato, vitamina B₁₂ y B₆ en LF, como lo demuestra Steegers en su estudio puede ser de significancia en la fertilización temprana o embriogénesis (8, 14)

En respuesta a la estimulación de hormonas gonadotrópicas en etapa preovulatoria, las células de la granulosa (CG) en el cumulus secretan un material mucoso sensitivo a la hialuronidasa, los proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Los proteoglicanos son macromoléculas con 80 a 5,000 kD de peso molecular (PM). Ellos son compuestos de proteínas centrales a la cual son unidas una o más cadenas de glicosaminoglicanos con alta carga negativa. Las propiedades de los proteoglicanos son determinadas por la composición de su proteína central así como el grado de modificación de su cadena lateral (15).

Dos diferentes proteoglicanos, ambos con alto peso molecular, han sido identificados en el LF de mujeres sometidas a fertilización in vitro o de cultivos de células de granulosa. El más grande de esos es el Condroitín sulfato con PM de 3,000 kD que consiste en un complejo de proteína central de 600 kd con 40 a 45 cadenas laterales de condroitín sulfato unidas. El más pequeño es el Heparín de Condroitín Sulfato con un peso molecular de 1,100 que incluye una proteína central de 3 a 400 kD y aproximadamente 20 cadenas laterales de condroitín sulfato y heparín sulfato, ambas proteínas son sustituidas con numerosos oligosacáridos unidos a O₂. En contraste las

células del cumulus secretan ácido hialurónico, indicando una divergencia metabólica de glicosaminoglicanos entre las CG y las del cumulus (2, 16).

La biosíntesis de los proteoglicanos y glicosaminoglicanos está regulada por FSH, prostaglandina E₂, Factor de crecimiento de transformación (TGF-1B) beta uno. La interacción entre matriz extracelular y las células tienen un mayor efecto sobre la proliferación, diferenciación y organización celular, pero el papel de los constituyentes de la matriz extracelular en el folículo ovárico no ha sido esclarecido existiendo una relación con los procesos de maduración del ovocito, ya que se han determinado altas concentraciones de sulfato de heparan en complejos de cumulus expandidos maduros, indicativo de el estadio prevulatorio de cada folículo individual. Además el LF de folículos maduros contienen elevadas concentraciones de ácido hialurónico cuando son comparados con el líquido de folículos de madurez intermedia.

Las glicoproteínas también juegan un papel esencial en la regulación del transporte del espermatozoide a través del tracto genital y en condicionar al espermatozoide antes de la fertilización. Pruebas de heparin sulfato de glicosaminoglicanos del líquido del oviducto de bovinos incrementan el porcentaje de fertilización durante el proceso de fertilización in vitro (FIV) cuando es añadido al medio y en adición el glicosaminoglicano hialuronidado no sulfatado mejora la retención de la motilidad espermática humana y la velocidad in vitro, no obstante los efectos de los proteoglicanos no han sido evaluados totalmente en tales estudios (17).

Otra posible importancia de los proteoglicanos en el LF es probablemente dado por las cargas negativas de los glicosaminoglicanos, los cuales crean fuerzas hidromecánicas y osmóticas de Donnan; actuando de ésta manera, contribuyen al influjo inicial lento de líquido y gradual expansión del espacio antral (2).

PROTEINAS: El contenido y composición del LF ha sido examinado en bovinos, cerdos, conejos, ratas y mujeres. El contenido total de proteínas de LF es igual a o más bajo a la del suero (cuadro 5). Esto puede variar con el estadio del estro pero el contenido en todos los folículos es similar con respecto al tamaño. Las proteínas específicas muestran alguna variabilidad; el fibrinógeno está presente en más baja concentración (Cuadro 6) (2, 3).

Los intentos a demostrar la presencia de proteínas específicas en el LF de cerdos, bovinos ratas y humanos por métodos de inmunoensayo han arrojado resultados variables, pero las inmunoglobulinas se han observado en el tracto reproductivo de éstas especies. Existe el fracaso a demostrar la presencia de componentes antigénicos diferentes al plasma en el LF, no obstante, indican que las técnicas inmunológicas son insuficientemente sensitivas a detectar tales sustancias (2, 3, 8).

El factor de la permeabilidad de los capilares de todos los folículos antrales, pequeños o largos, pueden ser sujetos a un mismo factor debido al contenido de proteínas del fluido colectado de folículos pequeños y largos, son con menor variación similares. Además la permeabilidad de la pared de los capilares puede ser alta, debido al contenido de proteínas del LF es muy similar al del suero, y sólo las distribuciones de proteínas específicas difiere. Aunque una barrera entre folículo-sangre es sugerido, la exclusión de moléculas con peso molecular mayor de 1,300.00 y exclusión parcial de fibrinógeno, con peso molecular de 340,000 sugiere un fenómeno pasivo de filtro molecular; no obstante, igual las grandes moléculas son encontradas en el LF (2, 3).

PEPTIDOS INTRAOVARICOS Y SU PAPEL POTENCIAL: Las gonadotropinas pituitarias regulan el crecimiento del folículo ovárico y su esteroidogénesis, maduración del ovocito y ovulación. Esto es claro que un incremento en el número de factores de crecimiento intraováricos existe a corregular o mediar las acciones de las gonadotropinas. Los factores de crecimiento son péptidos y polipéptidos que interactúan con receptores de superficie celular específicos, sobre ligandos de unión, iniciando procesos intracelulares resultando en división celular o diferenciación o inhibición de éstos procesos. Ellos actúan vía autócrina, paracrina o por mecanismos endócrinos. La mayoría han sido nombrados de acuerdo a su actividad biológica o su fuente. En adición a su papel en el desarrollo folicular, los factores de crecimiento pueden contribuir también a un desarrollo anormal; por ejemplo en el síndrome de ovarios poliquísticos en donde el crecimiento y

reclutamiento a un estadio antral pequeño están intactos en éste síndrome, pero la selección de un folículo preovulatorio dominante no ocurre. Esto lleva a la acumulación de muchos folículos antrales pequeños por mecanismos que no han sido determinados (8).

A continuación revisaremos el papel actual de los reguladores intraováricos determinados en LF y su papel en el desarrollo folicular normal y anormal así como la influencia en la esteroidogénesis, con énfasis sobre factores de crecimiento, citocinas y péptidos ováricos, sus receptores y sus proteínas de unión.

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL: El Factor de Crecimiento Epidermal (FCE), un péptido de 6 kD estimula la mitosis de pequeñas (más que grandes) células lúteas -granulosas así- como de granulosa preovulatoria. El FCE también tiene efectos sobre la esteroidogénesis de la granulosa. Este estimula la producción de progesterona en células lútea-granulosa cultivadas, la cual es inhibida por otros péptidos intraováricos: Sustancia inhibidora Mülleriana. Este también inhibe la actividad de la enzima aromataasa estimulada por la hormona folículo estimulante (FSH) y la síntesis de proteínas y la expresión del RNA mensajero de la aromataasa inducida por FSH en células lúteas de granulosa cultivadas de pacientes no estimuladas con ovarios poliquísticos y normales. En células lúteas-granulosa, el FCE estimula la producción de proteínas de unión a factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFBP)-1, la cual inhibe el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)-1, un

un estimulador de la producción de estradiol por la granulosa y esto ha sido sugerido que el factor de crecimiento epidermal puede además incrementar su propio papel en los procesos de luteinización (8, 10).

Los niveles del factor de crecimiento epidermal en LF de pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS) son significativamente más altos comparados con niveles en mujeres ovulatorias normales; en la mayoría de los estudios es reportado pero no en todos. El origen del factor de crecimiento epidermal en el LF no es claro, pero es probablemente derivado del suero. En vista de los efectos inhibitorios de éste factor de crecimiento sobre la aromatasa estimulada por FSH en la granulosa de PCOS y niveles altos en el LF de PCOS, ha sido sugerido que el factor de crecimiento epidermal es uno de los diversos inhibidores potenciales en los folículos del PCOS que atenúa la respuesta en la granulosa a las gonadotropinas (1, 8, 10).

FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS BASICO: El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) es un péptido de 18 kD que es mitógeno a las células de la granulosa humana. En otras especies, este es un modulador parácrino y autócrino de la síntesis de receptores de hormona luteinizante (LH) mediada por FSH, de la actividad de la aromatasa, producción de progesterona y puede ser involucrado en la nutrición del ovocito. Su papel como un modulador intraovárico del desarrollo folicular en humanos es desconocido (8, 18).

FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS: El factor de crecimiento derivado de plaquetas, un potente mitógeno para las células mesenquimales cultivadas, incrementa la formación de receptores de LH y sinergiza con la FSH en la producción de progesterona en la granulosa de las ratas. No obstante, funciones similares en el ovario humano permanecen a ser definidas (1, 10).

FACTOR DE CRECIMIENTO DE TRANSFORMACION BETA: El factor de crecimiento de transformación beta (TGF-B) un homodímero con peso molecular de 25 kD, es un péptido multifuncional que estimula así como inhibe la diferenciación y proliferación celular. En humanos TGF-B es inmunoreactivo en la teca y granulosa de folículos en desarrollo, incrementándose con el crecimiento de los folículos. Las células lúteas grandes y pequeñas también contienen TGF-B inmunoreactivo, el cual disminuye en la fase lútea tardía. El RNA mensajero del TGF-B es expresado en las células lúteas-granulosa y en el complejo cumulus-ovocito. Un papel para el TGF-B derivado de la granulosa en el desarrollo folicular puede ser sólo inferido de estudios en otros sistemas de animales, donde éste modula la esteroidogénesis, la mitosis de la granulosa, la ruptura de la vesícula germinal-ovocito, y mucificación de las células del cumulus (19).

FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A INSULINA: Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) I y II son péptidos

diferenciativos y mitógenos de 7 kD. IGF-1 estimula la síntesis de DNA en células de la granulosa y lúteas-granulosa maduras e inmaduras así como su proliferación celular y producción de aminoácidos. En sinergia con LH estimula la síntesis de progesterona. IGF-1 sólo y en sinergia con las gonadotropinas también estimula la actividad de la aromataasa P 450 y el RNA mensajero en la granulosa de folículos preovulatorios no estimulados y en folículos estimulados por las gonadotropinas. IGF-1 incrementa la síntesis de DNA y la síntesis de andrógenos en células tecales humanas cultivadas (8).

Los niveles de IGF-1 e IGF-11 circulantes no son dependientes del ciclo y no cambian en mujeres que sufren una hiperestimulación ovárica con gonadotropinas, registrando la importancia de la producción ovárica local y acción de éstos péptidos. Las células lútea-granulosa no expresan el RNA mensajero de IGF-1 pero expresan el RNA mensajero del IGF-11 el cual es regulado por vía del camino del AMP cíclico (cAMP). Este es expresado más abundantemente en la granulosa de folículos grandes (7 a 20 mm) y en el cuerpo lúteo. Las células lúteas-granulosa cultivadas secretan IGF-11, el cual es incrementado por la hormona del crecimiento, FSH, gonadotropina coriónica humana (hCG) y prolactina y se cree que promueve la función de las células lúteas en sinergia con la gonadotropina. IGF-1 está presente en el compartimiento de las células teca-intersticiales. Este es encontrado en altos niveles en el LF de folículos conteniendo complejos de cumulus corona-ovocito maduros (comparados con inmaduros). Así IGF-1 de origen tecal puede no sólo facilitar en la fase parácrina la acción de la gonadotropina sobre la mitosis y diferenciación de la granulosa sino

también jugar un papel parácrino en la maduración del ovocito. Este también puede jugar un papel autócrino en la producción de andrógenos tecales (20).

El IGF-1 está presente en el LF de mujeres menstruando normalmente y sus niveles son altos en folículos dominantes comparados con los de un cohorte (Cuatro 7). IGF-1 y 11 están presentes en el LF de pacientes que sufren una fertilización in vitro (IVF) y transferencia de embriones, y las concentraciones difieren entre los estudios, probablemente a diferentes métodos usados a extraer proteínas de unión a IGFs (IGFBPs), lo cual interfiere con los radioinmunoensayos de IGF. Los niveles de IGF no difieren en el LF de pobres respondedoras versus respondedoras normales a la estimulación con gonadotropinas.

Los péptidos de IGFs circulan, principalmente unidos a la familia de IGFBPs que modulan la acción de IGFs en las células blanco. Cinco de las seis IGFBPs han sido encontradas en el ovario humano. IGFBP-1 está presente después de la oleada de LH y sólo en las células de la granulosa de folículos dominantes y cuerpo lúteo. Esta es una de las diversas proteínas encontradas en el LF de pacientes que sufren una estimulación para IVF y transferencia de embriones y sus niveles se correlacionan con los niveles de progesterona del LF. IGFBP-1 inhibe la proliferación de las células de la granulosa in vitro mediada por IGF-1, teniendo un papel ésta proteína en modular la acción de IGF en el cuerpo lúteo. La IGFBP-3 su RNA mensajero es expresado en la teca de todos los folículos en la granulosa de los folículos dominantes. Este es el

mayor de los componentes del LF de ciclos estimulados con gonadotropinas. (Cuadro 7) y no difiere del LF de pobres respondedoras versus normales.

Las IGFBP-2, 4 y 5 están en la granulosa de folículos atrésicos, y el RNA mensajero de IGFBP 4 y 5 son expresadas en las células estromales y tecales. El perfil de IGFBP en el LF depende sobre el estado funcional del folículo. IGFBP-2 y 4 son altos sus niveles en LF de folículos atrésicos versus estrogénicos sugiriendo que ellos pueden inhibir la acción de IGF durante la selección folicular y la atresia. Las gonadotropinas e IGF-11 regulan la síntesis de la IGFBP-2 por las células lútea-granulosa, y los péptidos de IGF y TGF- β incrementan la secreción de IGFBP-3 por esas células. Las células tecales también secretan IGFBP-3. Los IGFs del LF y sus proteínas de unión probablemente sean derivadas del folículo (granulosa y teca) así como del suero por transudación (8, 21).

Los IGFs ejercen sus efectos vía de receptores específicos de superficie celular tipo I y II IGF. Los receptores de IGF tipo I están presentes en el ovocito, granulosa y la teca de folículos en desarrollo, así como en la granulosa luteinizada y cuerpo lúteo. Los receptores de IGF tipo I son altamente homólogos con los receptores de insulina y pueden modular la acción de la insulina en estados hiperinsulinémicos, resistentes a la insulina, incluyendo PCOS. La expresión de los genes de receptores tipo II es abundante en el cuerpo lúteo, aunque en la mayoría de los tejidos, el IGF-11 actúa vía

tipo I de receptores, aunque probablemente si actúa en receptores tipo II en ovarios humanos lo cual no ha sido determinado con certeza.

Un posible papel de IGFs y sus proteínas de unión en el PCOS ha sido sugerido. La insulina regula los niveles circulantes de IGFBP-1 el cual son disminuidos en pacientes con PCOS, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Los niveles de IGF-1 en suero total en PCOS comparados con mujeres ovulatorias normales son elevados y se correlacionan con la LH sérica en algunos estudios (22). No obstante el péptido IGF-1 libre el cual está elevado en pacientes con PCOS es incierto. Se cree que su elevación se deba a una disminución de IGFBP-1, la cual transporta un pequeño porcentaje de la capacidad de transportar IGF sérica total, sin embargo, los niveles séricos de las principales portadoras circulantes de los IGFs, IGFBP-3, son los mismos en las mujeres ovulatorias normales y en los pacientes con PCOS.

Las pacientes con PCOS pueden ser delgadas u obesas, tener resistencia a la insulina o hiperinsulinemia y tener niveles de LH sérica elevados o normales. El hiperandrogenismo puede ser explicado por la insulina actuando vía receptores de IGF tipo I en el estroma ovárico e incrementando la producción de andrógenos teca-intersticiales así como la producción directa de andrógenos tecaes estimulados por la LH elevada o por la estimulación de IGF-1 teçal, la cual puede estimular la producción de andrógenos tecaes, sólo o en sinergia con LH (23).

La granulosa en pacientes con PCOS produce poca aromatasa in vitro pero responde a la FSH y/o IGF-1 e incrementa su actividad de aromatasa. Debido a que el LF de pacientes con PCOS contiene niveles fisiológicos de FSH e IGF-1, éste ha sido postulado que el LF de folículos pequeños antrales de PCOS contiene inhibidores de IGF-1 y/o estimulación de FSH de aromatasa. Las IGFbps la cual tiene principalmente acciones inhibitorias sobre las acciones de IGF, han sido consideradas como posibles candidatos.

El incremento en los niveles de IGFBP-2 y 4 están presentes en el LF de PCOS, comparados con LF estrogénico, y son similares a éstos en LF atrésico de mujeres ciclando normalmente. Esas proteínas de unión libre probablemente son derivadas del aparato folicular debido a IGFBP-2 y 4 su expresión genética está localizada en la granulosa y la teca, y la expresión del gene de IGFBP-4 y 5 es abundante en el estroma de ovarios con PCOS y en folículos atrésicos. Esas proteínas de unión pueden inhibir la acción de IGF en folículos con PCOS, alterando el desarrollo folicular y la selección del folículo dominante (8).

CITOCINAS Y LA FUNCION OVARICA: Las citocinas comprenden un grupo de proteínas que modulan una variedad de funciones celulares. El enfoque de la interleucina, interferon gama y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) será sobre el ovario humano; donde estudios recientes apoyan un papel de la citocina sobre la

función ovárica, incluyendo la regulación de la esteroidogénesis. La orientación de éstos estudios ha sido sobre la detección de citocinas en compartimientos ováricos y sobre su modulación de la función esteroideogénica de las células ováricas. Leucocitos, incluyendo macrófagos, linfocitos T y monocitos, los cuales producen una variedad de citocinas, han sido inmunocitoquímicamente detectados en el cuerpo lúteo (24, 25).

El LF de folículos luteinizados estimulados con gonadotropinas contiene citocinas incluyendo interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6 y TNF- α . Las interleucinas modulan la proliferación, induce otras citocinas, y activa células T. TNF- α es un factor pleiotrópico que ejerce una variedad de efectos, incluyendo efectos proinflamatorios, promoción del crecimiento, inhibición del crecimiento, inmunomodulación, angiogénesis y toxicidad celular. Los niveles bioactivos e inmunoactivos de interleucina-6 en el LF son 3 a 30 veces más altos que los niveles detectados en suero, y los niveles de interleucina-6 en LF son similares en la presencia de endometriosis, anticuerpos antisperma o infertilidad tubal (26) (Cuadro 8).

Barak y cols. reportó una correlación positiva entre la interleucina-2 y los niveles de testosterona en LF humano, así como los niveles de interleucina-1 en LF y los niveles de progesterona. En comparación con otros autores no encontraron correlación entre los niveles de interleucina-2, progesterona y estradiol en LF (27). Una asociación entre TNF- α y niveles de esteroides en LF han sido reportados por

diversos grupos, apoyando un papel potencial para el TNF- α en la esteroidogénesis ovárica. Se han reportado que los niveles séricos de estradiol y progesterona son significativamente más bajos cuando el TNF- α es detectado. Los niveles de TNF- α parecen reflejar el estado esteroidogénico de los folículos, y los niveles mayores de TNF- α están presentes en folículos atrésicos comparados con folículos estrogénicos. El tratamiento con dexametasona de pacientes con PCOS siguiendo la estimulación ovárica resulta en niveles reducidos de TNF- α en LF comparados con niveles de TNF- α en pacientes que no recibieron tratamiento con dexametasona. Así la dexametasona puede, en parte, superar la atresia por disminuir los niveles de TNF- α (8, 27).

La interleucina-1, TNF- α e interferon-gama, tienen un efecto sobre la esteroidogénesis de células de granulosa de cerdo y rata cultivadas obtenidas de folículos en desarrollo, y los efectos de éstas citocinas sobre la secreción de estradiol y progesterona por células lútea-granulosa fueron reportadas recientemente. El interferon-gama es un homodímero de 23 kD producido primariamente por linfocitos T activados. Este inhibe la secreción de estradiol estimulante por la FSH y la producción de progesterona estimulada por hCG en las células de la granulosa humana. En contraste, la interleucina-1 y TNF- α no afectan la producción de progesterona pero reducen la secreción de estradiol estimulada por la FSH en las células de la lútea-granulosa. Similarmente Barak reportó inhibición de la producción de estradiol estimulada por la hCG por la interleucina-1 en las células lútea-granulosa (8, 28, 29).

Fukoka y cols. también reportaron interacciones entre el interferon-gama, TNF- α e interleucina-1 en modular la producción de estradiol y progesterona por la célula lútea-granulosa. El interferon-gama y el TNF- α actúan sinérgicamente a disminuir la producción de estradiol estimulada por la FSH y de progesterona estimulada por hCG. En adición, el tratamiento al mismo tiempo de interleucina-1 y TNF- α también inhibe la producción de progesterona estimulada por la hCG. Esos estudios apoyan un papel para las citocinas en la regulación de la esteroidogénesis por las células del folículo en desarrollo así como también del cuerpo lúteo (10).

INHIBINA, ACTIVINA Y FOLISTATINA: Continuando con la línea de investigación en el análisis de la fracción gel del ovario, hay poca duda que las células teca intersticiales y de la granulosa son capaces de elaborar un gran número de proteínas y es igualmente claro que la identidad de la mayoría de las proteínas elaboradas permanecen en un misterio en nuestro tiempo (1).

La inhibina es una proteína heterodímero de 32 kD primero identificada en el testículo como un inhibidor de la liberación de FSH pituitaria. Este también es producido por la granulosa del ovario. La inhibina es compuesta por una subunidad alfa y una de dos subunidades beta (B_A o B_B ; inhibina A o inhibina B). La activina fue identificada durante la purificación de la inhibina del LF con un estimulador de la

liberación pituitaria de FSH. Este es un homodímero de 28 kD de subunidades B inhibina ($B_A B_A$ o activina A, $B_A B_B$ o activina AB; $B_B B_B$ o activina B) (8).

La inhibina bioactiva liberada de las células de la granulosa luteinizadas puede ser estimulada por la LH y el RNA mensajero expresado por el cuerpo lúteo para subunidades B_A y alfa. Los folículos pequeños antrales y preantrales contienen Beta A y B, pero no alfa, mientras que los folículos grandes y normales (pero no atrésicos) contienen alfa, Beta A y B. La activina A se encuentra en los folículos primarios, secundarios y terciarios y en las células lúteas. La producción del dímero activina A por las células de la granulosa es estimulada por AMPc y gonadotropinas (30).

La activina actúa sobre la teca y granulosa humana, mientras que la inhibina actúa sólo en la teca (cuadro 9). En células de la granulosa cultivadas, la activina A recombinante humana incrementa la mitogénesis y disminuye la producción de progesterona estimulada por las gonadotropinas y la actividad de la aromatasas. Ambos, la producción de progesterona estimulada por AMPc y forskolin no son afectadas por la activina A recombinante humana. La activina A recombinante humana no afecta la mitogénesis de las células de la granulosa o esteroidogénesis y no bloquea el efecto de la activina. En la teca humana, in vitro, la activina inhibe, y la inhibina aumenta la producción de andrógenos estimulada por la LH (20).

Las acciones de la activina sobre el ovario humano son saturables y exhiben la especificidad de un receptor de alta afinidad. En roedores, el RNA mensajero codifica dos receptores de activina (designados tipo II y tipo IIB) y el tipo IIB ha sido clonado en la rata expresando su RNA mensajero. Nunca ha sido identificado en el ovario humano. La activina A recombinante humana se une específicamente a las células de la granulosa con un kD de 10/ng/ml,. Consistente con la DE 50 por efectos de la activina sobre la granulosa (1, 8).

La follistatina es una glicoproteína originalmente identificada en el LF como un inhibidor de la liberación de FSH no relacionado a la inhibina, la cual fue más tarde mostrada a unirse con alta afinidad a la activina y con baja afinidad a la inhibina. La follistatina está presente en el LF y suero. Los niveles séricos por radioinmunoensayo se incrementan con la estimulación gonadotrópica farmacológica. En los cultivos de granulosa de bovino y rata, la follistatina antagoniza los efectos de la activina sobre la esteroidogénesis, presumiblemente por competir con la activina para unirse a su receptor (es). Paralelamente, estudios sobre granulosa humana no han sido reportados. En adición a la follistatina, la proteína se une con una de alto peso molecular y de baja afinidad presente en el suero y LF (31).

Existe así alta evidencia in vitro para la producción regulada de activina e inhibina por la granulosa humana y por acciones de esos péptidos sobre el ovario humano. Pequeños folículos producen sólo activina, mientras que folículos dominantes y cuerpo lúteo producen ambas, activina e inhibina. El papel de esos péptidos in vivo

es todavía incompletamente conocido, en parte debido a la dificultad de los ensayos en suero y de LF por la interferencia con proteínas de unión y reacción cruzada con subunidades libres. Sin embargo usando un radioinmunoensayo para inhibina que reaccione cruzado con subunidades alfa libres, la inhibina sérica aumenta en la fase folicular tardía en paralelo con el folículo dominante e incrementará en los ciclos hiperestimulados con gonadotropinas en paralelo con los niveles de estradiol. Un reciente reporte usando éste ensayo compara los niveles de inhibina en LF de mujeres con ciclos normales y éstos con PCOS (donde los niveles de FSH son más bajos relativamente que los niveles de LH) se encontró ligeramente, pero no significativamente, niveles de inhibina (alfa) bajos en PCOS, sugiriendo que la sobreproducción de inhibina no es etiológico en éste síndrome (32).

Dos papeles pueden ser adscritos a la inhibina de las células de la granulosa: una acción sobre la pituitaria a suprimir la liberación de FSH e incrementar la disminución del apoyo trófico de folículos no dominantes, y una acción intraovárica a incrementar la producción de andrógenos tecales e incrementar el sustrato para la aromatización por el folículo dominante. La activina, por contraste, probablemente ejerce sus efectos solamente a nivel ovárico, éste disminuye la esteroidogénesis por ambos teca y granulosa, posiblemente por desacoplar la generación de AMPc de la unión de receptores de gonadotropinas. Su acción es probablemente ejercida sobre folículos en los cuales este exista en la forma no unida, por ejemplo, éstos que no expresan follistatina a altos niveles. La activina puede así promover la atresia en el

ovario humano, como lo hace en la rata. Ambos, inhibina y activina pueden así tener un papel en asumir que sólo un folículo ovula por ciclo (1, 8, 31).

Otros factores parácrinos y autócrinos del complejo sistema relacionado con la regulación ovárica han sido descritos, los cuales incluyen un inhibidor de la luteinización, inhibidor de la unión de Gonadotropinas, inhibidor de la maduración del ovocito, de los cuales la naturaleza química exacta no se conoce y su existencia ha sido propuesta obtenida en observaciones provistas en los procesos de luteinización, en la regulación del desarrollo folicular o en los procesos enigmáticos del arresto meiótico del ovocito que sólo pueden ser explicados por la presencia de éstos factores (1).

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA: La renina es una proteasa aspartyl capaz de incidir al sustrato angiotensinógeno hepático a formar angiotensina I (A1). Este último decapeptido, en turno, es convertido a angiotensina II (AII) por la enzima convertasa de angiotensina. Así la AII es vista como el principal péptido activo del sistema renina-angiotensina (RA). Aunque tradicionalmente visto en el contexto de líquidos y electrolitos de la economía, el sistema RA ahora ha sido observado en una variedad de tejidos. Existe evidentes cantidades de la existencia de un sistema RA ovárico intrínseco, papel en el cual la reproducción es explorado. Aunque mucho permanece a ser aprendido, hay poca duda que la actividad del sistema RA ovárica fluctúa en el curso del ciclo normal, alcanzando un ciclo normal, alcanzando un pico a la mitad del ciclo aproximadamente. Esto ha sido sugerido que los niveles altos

preovulatorios de AII en LF pueden ser involucrados en la maduración del ovocito en la ovulación directamente o a través de otros reguladores ováricos. Esto también ha sugerido que la AII puede jugar un papel en la formación del cuerpo lúteo así como en la regulación de la secreción de esteroides por la células lúteas. Aunque los estudios en animales sugieren que los antagonistas de la RA tal como saralasin pueden bloquear los procesos reproductivos, en la que estudios clínicos serán requeridos para determinar la validez clínica de los conceptos alcanzados en los modelos experimentales (1).

ENDOTELINAS: La endotelina (ET) es un potente péptido vasoconstrictivo con un residuo de 21 aminoácidos, originalmente aislado del sobrenadante de células endoteliales de porcino cultivadas. Tres distintos genes de ET han sido demostrados en el genoma humano, porcino y la rata, y el análisis de secuencia y clonación de éstos tres genes revelan tres isopéptidos. Recientes observaciones muestran una amplia distribución de receptores de ET-1 y la expresión de RNAm para ET fue demostrado por una variedad de tejidos. En adición, la ET ha sido identificada en sangre, líquido cerebroespinal, líquido amniótico, orina, leche materna y líquido seminal. Así la ET es secretada en muchos líquidos biológicos, y muchos participan en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la reproducción (33).

Kamada demuestra en su estudio que la endotelina 1 (ET-1) está presente en grandes cantidades en el LF, siendo de 100 a 300 veces mayor que la del plasma

humano y la de otros líquidos biológicos (300 pgs/ml o más en LF vs plasma de 1.7 pg/ml). No obstante los datos apoyan una liberación de la ET-1 de las células de la granulosa cultivadas. La concentración de ET-1 en LF de folículos inmaduros fue más alta que en los folículos maduros y postmaduros. Interesantemente una correlación positiva fue observada entre ET-1 y concentraciones de FSH en el LF al igual entre ET-1 y la concentración de IGF-II, relacionado un posible papel en la regulación del desarrollo folicular y función ovárica al actuar éstos factores en cooperación (1, 8, 33).

ENZIMAS: Al estudiar los mecanismos de la ovulación se han determinado otros componentes del LF, como son las enzimas. Schochet inició la investigación de los mecanismos enzimáticos implicados en la ovulación demostrando que el LF ataca la fibrina, degrada tejido conectivo, músculo y tejido ovárico. El espectro de enzimas determinadas en el líquido folicular de mujeres es enlistado en el Cuadro 10.

Excepto para plasmina y colagenasa que juegan un papel directo en la ovulación, el resto de enzimas no se ha especificado su papel. El activador de plasminógeno en el LF puede ser la enzima significante que inicie la cascada proteolítica que por último degrada la colágena y lleva a la ruptura del folículo (2, 34).

EICOSANOIDES: Las prostaglandinas (PGs), tromboxanos (Tx_s), y leucotrienos (L_ts) derivados enzimáticamente de ácidos grasos esenciales (EFAs)

constituye una única clase de ácidos grasos de 20 carbonos, hidroxilados, poliinsaturados categorizados como ecosanoides. Se ha implicado una relación en los procesos de la reproducción por ejemplo, en la secreción de gonadotropinas, se dice que las PGs y principalmente la PGE_2 regula la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas; ya que en experimentos una inyección periférica o en el tercer ventrículo de PGE_2 estimula la secreción gonadotrópica. En el folículo pre ovulatorio, ambos PGE_2 , $PGF_2 \alpha$ están incrementados en el LF, pero no ha sido establecido completamente si PGE_2 , $PGF_2 \alpha$ ambos son los inductores fisiológicos de los procesos de ruptura folicular. En el cuerpo lúteo humano, la $PGF_2 \alpha$ cuenta con un papel como luteolisina. Esta PG, producida por el cuerpo lúteo cuenta con sus receptores en el mismo tejido. En el humano la secreción de progesterona estimulada por las gonadotropinas por células luteinizadas in vitro. Contrariamente la PGE_2 estimula secreción de progesterona en ambas células lúteas de rata y humanas. En el ovario humano una perfusión del cuerpo lúteo fase temprana, media y tardía de la fase lútea a análogos $PGF_2 \alpha$ produce una rápida disminución en la secreción de progesterona. Posiblemente una disminución en la vida media corta en la secreción de progesterona vista in vivo con $PGF_2 \alpha$ es debido a un incremento en la producción de PGE_2 que es un antagonista a la acción de $PGF_2 \alpha$ (1).

CUADROS

**CUADRO NO. 1 PRESION OSMOTICA Y CONCENTRACION
DE SODIO, POTASIO Y PROTEINAS EN
LIQUIDO FOLICULAR Y SUERO**

	LIQUIDO FOLICULAR	SUERO
Sodio (mequiv/l)	148.8±8.9	150.5±8.9
Potasio (mequiv/l)	5.2±0.5	5.7±0.3
Osmolaridad (mOsmol/kg)	279.8±7.0	278.9±1.3
Proteinas (mg/ml)	35.8	

CUADRO NO. 2 NIVELES DE SODIO (g/l) Y POTASIO (mg/100 ML) EN SUERO Y LOS LIQUIDOS DE FOLICULOS A DIFERENTES ESTADIOS DEL CICLO DE OESTRUS DE LA VACA.

	SODIO		POTASIO	
	LF	SUERO	LF	SUERO
Pro-oestrus	2.7±1.01	2.6±0.1	22.6±1.3	17.8±0.3
Oestrus	2.9±0.1	2.8±0.1	26.1±3.1	18.6±1.1
Dioestrus	3.1±0.1	3.0±0.01	24.6±1.3	16.4±0.5
Quiestes foliculares	2.8±0.1	2.7±0.01	18.4±1.2	17.4±0.8

CUADRO NO. 3 ALGUNAS ESTIMACIONES DE LOS CARBOHIDRATOS (mg/100ml) EN LF Y SUERO DE BOVINOS Y FOLICULOS DE YEGUA

	LIQUIDO FOLICULAR	SUERO
Bovino		
Glucosa	39 a 43	
Otros Carbohidratos	8.3 a 10.5	
Acido Láctico	78 a 95	
Azúcares reducidos	35.3	
Hexosas unidas a proteínas	73.8	100.8
Foliculos pequeños	119.1	115.4
Foliculos grandes	91.9	115.4
Fucosa	6.84	7.6
Yegua		
Hexosa unida a proteína		
Foliculos pequeños	121.9 a 127.6	127 a 151.4
Foliculos grandes	80.6 a 99.2	

**CUADRO NO. 4 CONCENTRACIONES DE HEMOCISTEINA
METHIONINA, FOLATO, VITAMINA B₁₂ Y B₆
EN SANGRE Y LF OVARICO ***

	SUERO	LF Ovárico
HEMOCISTEINA (umol/L)	8.6	7.4
METHIONINA (umol/L)	19.9	15.9
FOLATO (umol/L)	17.7	15.7
VITAMINA B ₁₂ (pmol/L)	251.	196
VITAMINA B ₆ (nmol/L)	53	36

* Los Valores son Promedio

**CUADRO NO. 5 COMPARACION DE CONCENTRACION DE
PROTEINAS EN PLASMA Y LF EN DIVERSAS
ESPECIES-**

	SUERO (g/100 ml)	LF (g/100 ml)	RELACION LF/SUERO
BOVINO	9.1	7.0	0.77
CERDO	8.35	7.19	0.86
CONEJO	6.94	7.0	0.99
MUJERES	7.4	5.5	0.74

**CUADRO NO. 6 DISTRIBUCION DE PROTEINAS PLASMATICAS
EN SUERO Y LF***

PROTEINAS	Peso Molecular	Mujeres		Bovinos	
		Suero	LF	Suero	LF
Total de Proteina*		7.17	5.66	6.6	5.6
albumina	69,000	56.5	63.5	61.4	64.3
a ¹ -glicoproteina		3.5	2.8		
a-globulina				12.2	7.7
a ¹ -gobulina					
a ² -globulina		9.7	6.1		
B-globulina		11.4	10.6		
B ¹ -globulina				10.3	9.8
B ² -globulina				8.8	10.5
Ig-G	150,000	19.2	15.2	7.3	8.4
Fibrinogeno	340,000	3.7	1.1		
BI-lipoproteina	1'300,000	Presente	Presente	Ausente	Ausente

* Se identificaron 40 proteinas comunes en plasma y LF en bovinos

* Porcentaje de proteina en suero y LF

**CUADRO NO. 7 IGF-1, IGF11, IGFBP-3, EN LF PREOVULATORIO
HUMANO (NIVELES MEDIOS EN ng/ml±SE)**

Estado	Fuente	IGF-1	IGF-11	IGFBP-1	IGFBP-3
No estimulados	LF cohorte	72±32			
	LF dominante	124±44			
	Suero	166±46			
Estimulados (gonadotropinas + hCG)	LF	101±31	628±178	107±37	2400±761
	Suero	179±55	670±210	64±29	3589±546

**CUADRO NO. 8 CITOCINA EN LF DE CICLOS ESTIMULADOS
CON GONADOTROPINAS .**

CITOCINA	OBSERVACION
INTERLEUCINA-1	Correlación positiva con progesterona en LF (aunque existen algunos reportes con correlación negativa).
INTERLEUCINA-2	Correlación positiva con testosterona de LF.
INTERLEUCINA-6	Niveles de 30 o más altos en LF comparados con el suero.
TNF- α	Los niveles disminuyen en LF con la terapia con dexametasona.

**CUADRO NO. 9 ACCIONES DE LA ACTIVINA E INHIBINA
EN EL OVARIO HUMANO**

TIPO DE CELULA	PEPTIDO	E F E C T O
Granulosa	Activina	Incrementa la mitogénesis Disminuye la progesterona basal y la estimulada por gonadotropinas y la actividad de aromataasa.
Teca	Inhibina A	No efectos en mitogénesis o esteroidogénesis
	Activina A	Inhibe la producción de andrógenos estimulada por LH.
	Inhibina A	Aumenta la producción de andrógenos estimulada por LH.

CUADRO NO. 10 ENZIMAS EN LIQUIDO FOLICULAR

Endopeptidasa
Aminopeptidasa
Activador de plasminógeno
Plasmina
Dipeptidasa
Acido Fosfatasa
Fosfatasa alcalina
ATPasa

Lactato deshidrogenasa
Hialuronidasa
Pirofosfatasa
Kalicreína
Nucleotidasa
Tromboplasmina
Colagenasa
Estereasa arginina

GONADOTROPINAS Y HORMONAS ESTEROIDES EN EL LIQUIDO FOLICULAR

GONADOTROPINAS: Las gonadotropinas obviamente juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo del folículo, aunque los tempranos estadios del desarrollo folicular son probablemente dependientes de las gonadotropinas, generalmente es agregado que en los estadios finales si son francamente dependientes de éstas. Las observaciones de múltiples investigadores establecen que los folículos grandes tienen la necesidad de soporte gonadotrópico si ellos van a alcanzar el tamaño preovulatorio. La duración total de un proceso donde un folículo de clase 1 es convertido a un folículo clase 8, ha sido estimado en 85 días, de acuerdo con esto, el folículo clase 5 de la fase lútea tardía constituye el cohorte de la cual el folículo destinado a ovular en el próximo ciclo será reclutado (1, 3).

En la temprana fase folicular, la FSH estimula la actividad de la aromatasas de las células de la granulosa, resultando en un incremento en las concentraciones foliculares de estrógenos. El aumento de los estrógenos incrementan los receptores de FSH foliculares, incrementando la sensibilidad del folículo a la acción de FSH hormonal. Por la mitad de la fase folicular, un folículo (probablemente por elección) ha producido relativamente más estrógenos que otros folículos en su cohorte, incrementando la formación del antro y la adquisición de receptores de LH son anticipados. Así el folículo dominante disfruta de una secuencia ordenada de eventos

donde la FSH y estrógenos estimulan el crecimiento, formación del antro, y la aparición de receptores de LH.

El incremento dramático en la producción de estrógenos por el foliculo dominante, observable durante la segunda mitad de la fase folicular es acompañado por la caída en los niveles circulantes de FSH. Como resultado, otros (no dominantes) foliculos (del mismo cohorte) marcados con una disminución de la síntesis de estrógenos (así como elevados niveles de andrógenos) y disminuida sensibilidad a FSH, fracasan a prosperar. Aunque factores locales más que gonadotropinas y esteroides gonadales pueden estar en juego, las concentraciones intrafoliculares de gonadotropinas y de esteroides indudablemente son centrales a los procesos de amplificación por si mismos (1, 4).

Importantemente, cambios tecaes son también asociados con el desarrollo del foliculo dominante. El foliculo destinado a ovular, por el séptimo día del ciclo. Es rodeado por teca que selectivamente toma más LH que la teca de otros miembros no dominantes del cohorte. Por el día 9 de la fase folicular, la vascularidad de la teca del foliculo dominante es el doble que la de otros foliculos. Este incremento lleva a un incremento en la liberación de LH y lipoproteínas de baja densidad a la teca y de FSH a las células de la granulosa (6, 7).

Esto ha sugerido que el foliculo dominante secreta una sustancia proteínica capaz de inhibir la actividad de la aromatasa de foliculos pequeños ipsilaterales, éstos

en el ovario contralateral siendo similarmente afectados, tomando el foliculo dominante un papel activo y asegurando un estado preferido. Este efecto diferencial puede reflejar la relativa incapacidad de folículos pequeños a sobrevivir la caída en los niveles circulantes de FSH ocurriendo en la mitad de la fase folicular (presumiblemente en respuesta a un incremento negativo de la retroalimentación ovárica). Importantemente, un incremento en la respuesta a FSH parece ser acoplada con un marcado incremento en el índice mitótico de las células de la granulosa en desarrollo. Tales conclusiones son también en relación con la observación que las células de la granulosa de grandes folículos fueron significativamente más sensibles a la FSH (en términos de actividad de aromatasas) que esos pequeños folículos (35).

BIOSINTESIS DE ESTEROIDES: Las características funcionales del ovario fetal y del adulto ha sido sujeto de intensas investigaciones. Para distinguir las hormonas esteroideas secretadas por el ovario de esas secretadas por la adrenal, o esas producidas por el metabolismo periférico de los precursores, el contenido de las hormonas esteroideas de afluentes venosos del ovario y sangre venosa periférica han sido comparados; tales estudios revelan que el ovario secreta pregnenolona, progesterona, 17α -hidroxiprogesterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, testosterona, estrona y 17β -estradiol. Usando estudios de microdissección se identificó a la estrona y estradiol como los mayores productos del foliculo . En contraste, la progesterona y la 17α -hidroxiprogesterona fueron los mayores productos del cuerpo lúteo (3, 4, 18).

BIOSINTESIS DE ESTROGENOS: Las células de la granulosa son la fuente celular de los dos más importantes esteroides ováricos, estradiol y progesterona. Aunque las células de la granulosa y su contra parte luteínica son capaces de producir progesterona independientemente de otros tipos celulares ováricos, la biosíntesis de estrógenos requiere cooperación entre las células de la granulosa y sus vecinos tecaes. La participación de éstos dos tipos celulares y de las dos gonadotropinas (FSH y LH) se ha llamado la teoría de las dos células/dos gonadotropinas, un proceso integrativo requerido para la síntesis de estrógenos. De acuerdo a esto, los andrógenos aromatizables dependientes de la LH, derivados de la teca son conjugados por la actividad de la aromataasa de las células de la granulosa inducidas por FSH. Virtualmente en todas las especies, la estrona ovárica y el estradiol derivan de los precursores androgénicos androstenediona y testosterona.

La biosíntesis de estrógenos foliculares requiriendo células teca-intersticiales y de la granulosa fue primero descubierta por Falck en 1959 a través de una serie de experimentos. Las bases bioquímicas de la teoría de las dos células/dos gonadotropinas, fue más tarde probada por Ryan y Petro, quienes los hallazgos revelaron que las células teca-intersticiales son las productoras de andrógenos C-19, siendo las células de la granulosa el sitio primario de la aromatización. No obstante Ryan y cols. fueron capaces de mostrar que la conversión de acetato a estrógeno es substancialmente incrementado por la co-incubación de células tecaes y de la

granulosa. Por lo tanto, se resume lo siguiente por los autores en 1967: Los precursores esteroides C-19 son elaborados por las células teca-intersticiales y son transferidas a través de la membrana basal del foliculo a las células de la granulosa donde ellas son aromatizadas a estrógenos (1, 36).

En relación con esas conclusiones, los estudios de las células de la granulosa revelan que la FSH, pero no la LH, estimulan la síntesis de andrógenos en una manera contingente sobre la provisión de un substrato androgénico aromatizable exógeno. En contraste, la teca aislada no produce significantes cantidades de estrógenos bajo alguna circunstancia experimental. En verdad, la actividad aromatasa de las células de la granulosa fueron estimadas ser al menos 700 veces mayor que las de las células de la teca de grandes foliculos preovulatorios. Como tal, esos resultados son consistentes con la hipótesis de que las células de la granulosa son el sitio principal de síntesis de estrógenos en el foliculo preovulatorio dominante. Esas observaciones sugieren que los andrógenos (principalmente androstenediona) producidas por las células tecales estimuladas por la LH es el principal substrato para la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa estimuladas por la FSH. Aunque la estrona será el estrógeno más inmediato producido, éste en turno es realmente convertido a estradiol como un resultado de la actividad de la enzima esteroideogénica 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. El complejo proceso de aromatización involucra la pérdida del grupo metil C-19 angular y la eliminación esteroespecifica del 1 β y 2 β hidrógenos del anillo

A del precursor androgénico. Como tal, un total de tres hidroxilaciones son requeridas por mola de estrógeno formado (1, 18).

BIOSINTESIS DE PROGESTINAS: Las células de la granulosa (parecidas a la teca-intersticiales) es ampliamente dotada para llevar a cabo la síntesis de progesterona. No obstante, central a éste proceso es la disponibilidad de suplemento abundante de colesterol, el cual sirve como material principal para la cascada esteroidogénica. Estudios han mostrado que el colesterol usado para la síntesis de membranas y producción de hormonas esteroideas es derivado primariamente de las lipoproteínas séricas circulantes, más de la síntesis de novo de acetato. Las lipoproteínas de baja densidad son conocidas a unirse a receptores de membrana específicos, el complejo receptor-LDL entran a la célula por endocitosis mediada por el receptor, fusionándose a lisozimas donde los ésteres de colesterol son hidrolizados a producir colesterol libre. El colesterol libre en turno es re-esterificado y almacenado en el citoplasma en gotas de grasa. Cuando es encarada una demanda esteroidogénica, los ésteres de colesterol son hidrolizados y el colesterol libre es transportado a la mitocondria para iniciar los procesos de esteroidogénesis (37).

La importancia de LDL colesterol para la secreción ovárica es demostrada por la observación que la presencia de LDL es requerida para la secreción máxima de progesterona por las células cultivadas. La disponibilidad de LDL a varios compartimientos ováricos puede influenciar en la producción de hormonas esteroideas. Por ejemplo, la relativa avascularidad de las células de la granulosa en su estrato se

espera capacidad biosintética limitada de progesterona. En relación con ésta observación, el LF humano contiene poco o no LDL, de ahí limitando las células de la granulosa preovulatorias la capacidad a producir progesterona. Por lo anterior, las concentraciones intrafoliculares de progesterona aumentan después del pico de LH (previo a la ovulación) sugiriendo una disminución en la barrera de lipoproteína. No obstante, siguiendo la ovulación, la vascularización del cuerpo lúteo provee el medio por el cual LDL es liberado a las células de la granulosa luteinizadas, permitiendo una síntesis de progesterona a iniciar (18).

Aunque las lipoproteínas constituyen la más abundante fuente de colesterol, el colesterol generado endogenamente puede ser también empleado. El colesterol por sí mismo es en turno convertido a pregnenolona a través de la escisión de cadenas laterales de colesterol por la enzima mitocondrial. La subsecuente conversión pregnenolona a progesterona ocurre realmente por la abundancia de enzimas citoplásmicas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y Delta 4-5 isomerasa. Poco es conocido con respecto a el papel funcional, si hay alguno, de la enzima esteroidogénica 20 α hidroxesteroide deshidrogenasa y 5 α -reductasa al nivel de la célula de la granulosa humana (38).

BIOSINTESIS DE ANDROGENOS: Los últimos estudios de teca humana aislada revelan que el estrado tecal es la mayor fuente celular de andrógenos foliculares y que LH, más que FSH, estimula la producción de andrógenos tecales. En

contraste. La producción de andrógenos por células de granulosa humana aislada cultivada provee insignificantes con o sin la adición de gonadotropinas. La biosíntesis de andrógenos C-19 es lo dominante de las células teca-intersticiales. Por lo tanto, éste tipo celular es dotado con la maquinaria necesaria a generar precursores progestágenos C-21. Más importante, no obstante, las células teca-intersticiales son dotadas con 17 α -hidroxilasa/17,20 desmolasa capaz de convertir precursores pregestacionales delta 4-5 (pregnenolona y progesterona) a productos C-19 (dehidroepinandrosterona y androstenediona respectivamente). Consecuentemente puede ser vista como una característica exclusiva de las células teca-intersticiales (1, 4, 35).

LIQUIDO FOLICULAR Y EL CRECIMIENTO, MADURACION Y RUPTURA DEL FOLICULO

CRECIMIENTO DEL FOLICULO Y MADURACION DEL OVOCITO:

Durante el avance en el conocimiento de los componentes del LF, el establecimiento de programas de reproducción asistida, empleo de fármacos para la inducción del crecimiento folicular múltiple y la obtención de un número mayor de ovocitos por ciclos, ha sido de vital importancia para conocer los factores relacionados con el crecimiento folicular y maduración del ovocito los cuales hasta la actualidad no son del todo explicados.

Por lo anterior mencionado, es conocido que el LF constituye el micro-ambiente del foliculo que nutre al ovocito y que éste es substancialmente un exudado del plasma, lo cual es condicionado por las células del foliculo. Así, ciertos parámetros bioquímicos en el LF indican el estadio de desarrollo del foliculo. Estas hormonas, por ejemplo, estradiol, progesterona y prolactina, así como otras diversas substancias, todas han sido sugeridas como marcadores potenciales de la calidad del ovocito. Por lo tanto, muchos intentos se han hecho a correlacionar las concentraciones de éstas substancias en el LF con el desarrollo subsecuente, maduración y fertilizabilidad. Esto ha sido probado que el IGF-1, el mediador a través del cual la hormona del crecimiento ejerce su acción, estimula la síntesis de estrógenos. Por esta razón la

hormona del crecimiento es usada en la inducción de la ovulación a mejorar la respuesta folicular, que la administración de la hormona del crecimiento parece a incrementar la sensibilidad ovárica a la estimulación con gonadotropinas. Previos estudios han mostrado que los diferentes protocolos de inductores de la ovulación pueden alterar el microambiente hormonal en el LF, afectando la fertilización y segmentación del ovocito (4).

Sutter encuentra alteraciones citogenéticas en ovocitos humanos no fertilizados correlacionados con los niveles de esteroides en el LF. Establece que la madurez del ovocito fue correlacionada con un incremento en el contenido de progesterona en LF y una significativa disminución en los niveles de andostenediona (A). El análisis cromosomal reveló que de 397 ovocitos, 84 fueron anormales (que exhibieron cero, uno o tres pronúcleos y/o éstos que no segmentaron después de 48 horas fueron preparados para el análisis citogenético). Las anomalías comprendieron poliploidia y/o cromosoma condensado prematuramente. En este grupo los niveles de A a estradiol fueron significativamente más altos. No se relacionó con los esquemas de estimulación (grupo utilizado citrato de clomifeno y hGM y otro hGM combinado con GnRH-a), concluyendo que las anomalías del ovocito se correlacionan con altos niveles de A en LF y que la fertilización del ovocito es también determinada por factores del ovocito intrínsecos más que la madurez sola (5).

Otros estudios encaminados a buscar también a uno o varios marcadores bioquímicos del estado de madurez del ovocito presentes en el LF y correlacionarlos con el aspecto morfológico del mismo, utilizando el complejo ovocito-corona radiata-cumulus oofurus (COCC) su grado de expansión. Concluyen que no se encontró correlación entre los niveles de proteínas, estradiol y progesterona con la morfología del COCC. Además el LF obtenido en protocolos de estimulación para procedimientos de FIV o GIFT, fue sometido a barrido espectrofotométrico en el área de luz visible entre 350 a 600 nm para medir la absorbancia de su pigmento amarillo. Se concluye que la presencia de éstos picos de máxima absorbancia pueden ser de utilidad para corroborar el estado de madurez del ovocito, sobre todo en los casos de GIFT en donde la transferencia de los mismo es inmediata, y se puede elegir con mayor seguridad los ovocitos (39).

LUTEINIZACION DEL FOLICULO: Durante los estadios finales de la maduración folicular, hay un aumento (10 a 15 veces) en la concentración de receptores foliculares para la hormona luteinizante (LH)/HCG, un incremento en la capacidad de las células de la granulosa a secretar progesterona y un incremento en el contenido de líquido folicular de progesterona y estradiol. Esos cambios aparentemente regulados no sólo por las gonadotropinas, sino también por factores ováricos locales, ya que sólo una pequeña fracción de la población folicular madura en cada ciclo. Observaciones hechas indican que la secreción de progesterona inducida por FSH por células lúteas-granulosa humana es significativamente incrementada por

el LF humano. Además la secreción de progesterona inducida por HCG fue más alta pre-cultivadas con FSH+LF, comparadas con cada uno por separado. Los estudios de Bar-Ami realizando éstos experimentos indican que el grado de estimulación es significativamente mayor cuando el LF es obtenido de folículos o complejo ovocito-cumulus intermedio comparados con éstos los cuales son inmaduros (18).

Entre los factores los cuales han sido identificados en LF y encontrados a alterar la actividad esteroideogénica celular folicular son: IGF-1, péptido atrial natriurético, EGF, TGF- α , transferrina y melatonina aunque puede uno añadir otros a ésta lista como; sistema renina-angiotensina, activina, inhibina y proteínas placentarias. Asumiendo como conclusión que la actividad estimuladora del LF puede ser adscrito a los efectos acumulativos de diversos componentes o que hay un factor especial el cual significativamente contribuye a la actividad luteinizante (1, 3, 18).

LA MEMBRANA FOLICULAR COMO BARRERA: Las sustancias están siendo constantemente transmitidas a través de la membrana folicular en ambas direcciones. El porcentaje de transmisión depende sobre el tamaño de las moléculas, y quizá sobre sus propiedades químicas. Componentes tales como agua tritida son distribuidos en iguales concentraciones en el plasma y LF dentro de unos minutos, mientras que grandes moléculas permanecen en bajas concentraciones el LF. La transferencia de líquido a sanre también es restringido. Los esteroides son retenidos en el LF quizá a través de unirse a proteínas de unión. Salida de componentes del

líquido folicular ocurre a través de la vena ovárica e indirectamente por vía del líquido intersticial y tisular (3, 18).

RUPTURA DEL FOLICULO: En el humano, ambas LH y hCG han mostrado estimular la ruptura del folículo maduro. La LH ha sido a mostrar la síntesis de prostaglandinas incrementada, la cual puede mediar el estímulo ovulatorio de la LH. Mecánicamente, la ovulación consiste de un rápido crecimiento del folículo seguido por la protrusión del líquido folicular por la superficie de la corteza ovárica. No obstante la oleada de LH marca el final de la fase folicular del ciclo y precede la ruptura hasta por 36 horas. Más que explosivo, la expulsión del ovocito y fluido antral, sugieren que éste último no está bajo presión. Las medidas directas han demostrado una presión intrafolicular baja. Las consideraciones que condicionan una ruptura folicular han sido encaminadas a cambios en la composición del líquido antral durante el periodo de crecimiento folicular preovulatorio rápido. Alternativamente, la formación de estigma y ruptura reflejan los efectos de las enzimas hidrolíticas actuando localmente sobre el sustrato de proteínas en la lámina basal, generalmente se presume que la conversión mediada por el activador de plasminógeno a plasmina contribuye a la digestión proteolítica de la pared folicular, un pre-requisito para la ruptura folicular (91, 35).

EL LIQUIDO FOLICULAR, EL OVIDUCTO Y EL ESPERMATOZOIDE

EL TRANSPORTE DEL OVOCITO A LA AMPULA: Una función de LF parece ser ayudar al ovocito en su escape del folículo. Un cambio del contenido folicular existe al acercarse la ovulación, y la unión del ovocito a las células de la granulosa de la pared del folículo será débil. El ovocito, con sus células que lo rodean es finalmente perdido de su unión con el folículo, y permanece libre en el antro. Los movimientos de ovocito a través de éste al estigma justo antes de la ovulación es facilitado por el LF.

El LF también juega un papel distinto en el transporte del ovocito al oviducto, especialmente en especies donde éste está presente en cantidades copiosas. Las diferencias en las especies son probablemente reflejo en la naturaleza de el líquido folicular, y especialmente su viscosidad. En el cerdo de Guinea, conejo, mono y el humano, el folículo, el ovocito es "anclado" a la superficie del ovario cuando el líquido sale lentamente del folículo. Los movimientos de la fimbria sobre el ovario en la región del folículo crea las condiciones necesarias para que los movimientos de los cilios "atrapen" al ovocito gentilmente del ovario hacia la ampulla, aunque hay amplias diferencias entre las especies en la naturaleza de los movimientos del oviducto. La unión del ovocito a la superficie del ovario es evidentemente determinada por la

mayoría de los elementos del LF, y puede ser principalmente el ácido hialurónico. No podemos pasar por alto que el oviducto cuenta con influencia hormonal por lo cual sufre cambios histológicos de acuerdo al ciclo: justo antes de que el cuerpo lúteo empiece su regresión el epitelio oviductal ha sido atrofiado e inicia su regresión, y durante la regresión del cuerpo lúteo, el oviducto responde con un proceso de entrada a la ciliogénesis. El aumento de estradiol que ocurre en la fase media folicular no es necesario para el desarrollo morfológico de un epitelio oviductal secretorio ciliado completo. Tal incremento puede ser importante al porcentaje de secreción de glicoproteínas oviductales específicas; hay evidencia que el porcentaje de transudación del líquido oviductal y la secreción de proteínas oviductales son estimuladas por el aumento en los niveles de estradiol sérico en el período periovulatorio.

CAPACITACION DEL ESPERMATOZOIDE: Un papel para el LF en la capacitación del espermatozoide fue propuesto cuando los huevos de hamster fueron fertilizados in vitro por espermatozoides epididimales en la ausencia de secreciones uterina y oviductales. La capacitación del espermatozoide de hamster fue alcanzado con LF bovino y los ovocitos de ratón fueron fertilizados en la presencia de éste líquido.

Se ha documentado por lo tanto, que el LF de mujeres afecta la función del espermatozoide incluyendo la estimulación de la capacitación, inducción de la reacción de acrosoma, efectos quimiotácticos sobre el espermatozoide, y promoción del patrón

de motilidad hiperactivo. Además, el pretratamiento de espermatozoides con LF precediendo la transferencia intratubaria durante GIFT mejora el porcentaje de embarazos.

Estudios de Eriksen dirigidos a investigar si dos diferentes proteoglicanos aislados de LF humano afectan el mantenimiento de la motilidad espermática, menciona que éstos incrementan la capacidad fertilizante del espermatozoide por incrementar su motilidad y el porcentaje de reacción de acrosoma, aunque no es claro aún si algún componente en particular o combinaciones de los mismos son los específicamente responsables (16).

Es conocido que la reacción de acrosoma del espermatozoide es un requisito para la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida y subsecuente fertilización. Se han propuesto un número de iniciadores fisiológicos de la reacción de acrosoma el cual incluye al líquido folicular, cúmulus y a la zona por sí mismo. En el estudio de Saaranen encontró que la progesterona del líquido folicular influencia en la descarga del acrosoma del espermatozoide de vanguardia, lo cual puede ayudar a disponer las células del cúmulus, así facilitando la progresión de espermatozoides adicionales a través del cúmulus a la zona (41).

Otros estudios que apoyan lo investigado por Saaranen, son los realizados por Blumenfeld, donde realiza un pretratamiento del espermatozoide con líquido folicular humano en pacientes masculinos subfértiles antes de intentar un

procedimiento de reproducción asistida más costosos (FIV o GIFT) con mejores resultados de embarazo que los grupos no tratados con LF, atribuyendo como posible mecanismo el efecto del LF en incrementar la proporción de espermatozoides a sufrir una reacción de acrosoma (42).

Cuando se emplea el recurso de GIFT y el líquido folicular es usado como un medio de capacitación del espermatozoides y medio de transferencia de gametos, los resultados y el porcentaje de embarazos mejora, como lo demuestra Fakih, en su reporte, al utilizar medio de transferencia ham F-10: Porcentaje de embarazos 50 vs 21%, incremento en el porcentaje de embarazos con factor masculino 44% versus 0%, incremento en la incidencia de embarazos múltiples 40 vs 17%. Los anteriores resultados sugieren que el pretratamiento del espermatozoides con LF mejora la capacidad fertilizante del espermatozoides (43).

Otras propiedades atribuidas al líquido folicular es la presencia de un factor químico de atracción para las células germinales masculinas como lo estableció Villanueva, Badillo, Kably al realizar un modelo in vitro usando 0.8% placas de garosa, éste demostró que el número de células migrando hacia el medio contenido LF de pacientes de un programa de GIFT, clasificado como maduro de acuerdo a la morfología del ovocito, fue significativamente más alta que éstas migrando hacia los medios de control y posteriormente afinando los estudios demuestran que el factor

quimiotáctico para los espermatozoides identifica a la progesterona como dicho factor (44, 45).

INMUNOLOGIA DEL LIQUIDO FOLICULAR

La identificación de una serie de factores de que componen el líquido folicular ha permitido conocer con mayor profundidad la fisiología del LF, aunque muchos de sus componentes no se han podido precisar una función específica. El aspecto inmunológico representado por la presencia de interleucina, citocinas, macrófagos, etc., se han relacionado con funciones propias de la esteroidogénesis, la maduración ovocítica, ovulación, quimiotaxis del espermatozoide y transporte a través del oviducto como se describe en los siguientes reportes.

Leukides examinó el LF de 20 pacientes sometidas a un programa de fertilización in vitro y transferencia de embriones así como su contenido de células tisulares. Aunque las células lúteas-granulosa predominan en el LF, ellos encontraron que los monocitos y los macrófagos comprenden del 5-15% de las células tisulares del foliculo (24).

Su presencia en tejido ovárico además de justificar una fagocitosis del cuerpo lúteo, su papel se sugiere que va más allá, ya que su producción de interleucinas influye en procesos de esteroidogénesis.

Ya que el LF se ha considerado como un reservorio enzimático que controla la permeabilidad de los capilares del antro y la degradación proteolítica de la colágena, la cual lleva a la ruptura de la pared folicular, de las cuales el complemento activo está presente en el LF.

Se le atribuye que medie los eventos de la ruptura folicular contribuyendo a los mecanismos multifactoriales enzimáticos de la ovulación (46).

Muchos componentes del LF por ejemplo esteroides, prostaglandinas, histamina, han demostrado efectos inmunorregulatorios in vitro e in vivo, Castilla propuso a elucidar las posibles funciones inmunológicas del LF, el cual fue obtenido de una captura de ovocitos de mujeres sometidas a un programa de FIV-TE. Fueron estudiadas sobre la respuesta de la proliferación de los linfocitos a la concavalina A, sus resultados indicaron que el LF inhibe la respuesta mitógena de los linfocitos a la concavalina A, y además induce células inmunosupresoras in vitro, (25).

Estos resultados no son del todo desconocidos, ya que experimentos similares con otros líquidos del organismo como el líquido peritoneal, el cual es considerado un exudado del ovario presenta actividad inmunosupresora (y no un exudado del peritoneo pélvico ni de la secreción tubal) (47, 48).

Dentro de los líquidos del organismo se ha descrito diversas propiedades singulares de los mismos, como lo es la actividad antibacteriana del líquido amniótico, al presentar una capacidad inherente de resistir las infecciones bacterianas (49).

Derrigton y Soothill emplearon técnicas inmunoquímicas al estudiar el líquido amniótico, concluyendo que las proteínas del mismo son derivadas del suero materno por una selectiva ultrafiltración y mostrando la presencia de diversos factores conocidos a ser antibacterianos como son lisozima, transferrina, inmunoglobulinas TS, actividad a anticuerpo específica, globulina B (50).

Aunque el LF folicular comparte muchas propiedades y características con otros líquidos del organismo, al iniciar el presente estudio no existía en la literatura mundial alguno acerca de describir una actividad antimicrobiana, ya sea bactericida o bacteriostática del LF como lo fue reportado con el líquido amniótico, suero, etc. No fue sino recientemente donde Gurgan describe que el LF humano de folículos preovulatorios en pacientes sometidos a una FIV inhibe el crecimiento in-vitro de microorganismos gram positivos, propiedad atribuida al contenido de lisozimas y progesterona del líquido folicular, como posibilidad probable establecida por los autores (51).

OBJETIVOS

De acuerdo a la revisión bibliográfica, las actividades del LF han sido estudiadas en función de explicar los procesos fisiopatológicos de la ovulación, pero las características de algunos de los componentes del LF orientan a la posible actividad antimicrobiana.

La observación clínica al realizar la captura ovular con guía ultrasonográfica a través de una punción vía vaginal, el cual no es un medio estrictamente estéril y, como resultado no existen casos de infección en el procedimiento post captura ovocítica, se diseñó el presente estudio, a fin de determinar si existe in-vitro actividad antimicrobiana del líquido folicular obtenido de pacientes en un programa de Fertilización in vitro y transferencia de embriones (FIV-TE) o transferencia intratubaria de gametos, ante diferentes inóculos bacterianos.

MATERIAL Y METODOS

El período de estudio estuvo comprendido entre marzo de 1993 a febrero de 1994, realizándose en el Departamento de Reproducción Asistida en conjunto con el Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Perinatología.

Se evaluaron 110 líquidos foliculares de 110 pacientes sometidas a captura ovular para FIV-TE o GIFT. Las mujeres ingresadas al programa de Reproducción Asistida contaban con antecedente de esterilidad primaria o secundaria por factor tubo peritoneal o de esterilidad de causa no determinada con previos cultivos vaginales y endocervicales negativos antes de la punción y que no hubiesen recibido tratamiento antimicrobiano alguno, cuando menos 60 días antes del procedimiento.

Se excluyeron los líquidos foliculares sanguinolentos o hemolizados, así como en aquello se comprobara contaminación como resultado de la obtención o del manejo del LF, material de endometriosis o exposición a soluciones antisépticas de los equipos de captura al igual que pacientes que les diagnosticara patología infecciosa al momento del procedimiento.

Todas las pacientes fueron tratadas para lograr un desarrollo folicular múltiple mediante la estimulación ovárica controlada con el esquema de hiperestimulación ya reportado y que se utiliza actualmente en la Unidad de Reproducción Asistida del INPer consistiendo en la administración de FSH pura y Menotropinas a partir del tercer día del ciclo, con monitoreo por cuantificación de estradiol sérico y ultrasonografía vaginal. Una vez que tiene por lo menos 4 folículos de 16 mm ó más de diámetro y 250pg de estradiol por folículo, se aplican 10,000 Us de hCG y 36 horas después se procede a la aspiración folicular.

La técnica de punción ovárica fue por vía vaginal en 97 casos (FIV-TE) y abdominal en 13 (GIFT). En los casos de captura vaginal (N=97) la paciente fue llevada a quirófano y bajo efectos de sedación se realizó un aseo vaginal con solución de irrigación sin antibióticos. La punción se realizó a través de guía ultrasonográfica, con un transductor vaginal 4 MHZ cubriendo con un preservativo previamente esterilizado, y con un Set de aspiración Hazout Oocyte Collector (Laboratorios CCD, Paris), una vez realizada la aspiración se puso especial cuidado en que el LF obtenido no estuviese en contacto con el medio de cultivo ya que tiene antibióticos tomando las mismas precauciones para los casos obtenidos por punción directa (minilaparotomía olaparoscópica) en los casos de punción abdominal (N=13).

El LF fue transportado al laboratorio de gametos adjunto al quirófano, y una vez identificado el ovocito, fue enviado al laboratorio de microbiología del Instituto para ser procesado, primero realizando un cultivo del mismo para descartar contaminación y posteriormente evaluar su capacidad antimicrobiana. En el cultivo se investigó la presencia de los siguientes microorganismos: *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *L. Monocytógenes* y *Anaerobios*.

Se excluyeron 61 muestras de FIV-TE y 12 de GIFT por considerarse contaminadas o no aptas (hemolizadas). Excluidas las muestras contaminadas, los restantes líquidos foliculares (36 de FIV-TE y 1 de GIFT) fueron probados en cuanto a actividad antibacteriana. Las cepas de referencia utilizadas en la prueba son de American Type Culture Collection: *E. coli*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *L. monocytógenes* y *C. Albicans*.

Para ajustar las concentraciones bacterianas (de cultivos jóvenes de 18 a 24 horas de incubación) se prepararon 5 tubos No. 1 de la serie de Mac Farland y se obtuvo una media de las lecturas de absorbancia a 500 nm., posteriormente ésta absorbancia que fue de 0.13 se utilizó como medida estándar para ajustar las especies bacteriana, usando como blanco para las lecturas, solución salina al 0.9%.

Así, partiendo de la premisa teórica de que en el Tubo 1 de Mac Farland se tiene una equivalencia de 1×10^8 Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml) se realizaron cuentas viables por duplicado de las especies bacterianas y de levadura (*C. Albicans*) a probar en el ensayo in vitro, con el objetivo de establecer el número de diluciones seriadas necesarias para alcanzar una concentración de 7.4×10^4 y 7.5×10^5 UFC/ml para *E. coli*, *S. agalactie grupo B*, *S. aureus*, *Pseudomona a*, *Lysteria monocitogenes* y *Candida albicans*; así mismo verificar por medio de cultivos en placa, la dilución idónea que proporcionaría un número de colonias que pudiera contarse fácilmente y con exactitud, corroborando la cantidad real del inóculo bacteriano.

Realizados los controles de calidad del líquido folicular y los controles del inóculo bacteriano se procedió a la realización de la prueba, consistiendo de los siguientes tubos:

Tubo 1: (Líquido folicular problema) 0.9 ml de la muestra de LF más 0.1 ml del inóculo bacteriano preparado previamente.

Tubo 2: (Cultivo de crecimiento positivo) 0.9 ml de caldo Tood Hewit (TH) más 0.1 ml del inóculo bacteriano preparado previamente.

Todos los tubos se incubaron en una estufa bacteriológica a 37° C por un período de 24 a 48 horas. Se efectuó recuento de colonias bacterianas por medio de cuentas viables en placas de medios correspondientes a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas de incubación, los cuales el valor se expresa en escala logarítmica en base 10.

Como definición operacional y análisis del estudio se establece: Actividad inhibitoria del líquido folicular: Cuando haya una diferencia de dos o más logaritmos en unidades formadoras de colonias por ml, entre el líquido folicular problema y su control de crecimiento positivo. Actividad no inhibitoria del líquido folicular cuando haya una diferencia menor de dos logaritmos (base 10) en UFC/ml entre el LF problema y el control de crecimiento positivo.

RESULTADOS

En la Tabla 1, se puede ver las cuentas de unidades formadoras de colonias (UFC) en el LF y en la Tabla 2, las cuentas de UFC en el caldo de cultivo de control, expresados en escala logarítmica en base 10.

Considerándose actividad inhibitoria del crecimiento microbiano cuando hay una diferencia de dos o más logaritmos en UFC/ml entre el líquido folicular y su control de crecimiento positivo en el caldo de cultivo de TH.

En la gráfica 1, las observaciones hechas en las curvas de crecimiento de *E. coli* desde las 2 hasta las 24 horas existe una diferencia de más de dos logaritmos entre el recuento de LF y el de caldo de cultivo.

En la Gráfica 2, se puede apreciar que también se establece la diferencia de más de 2 logaritmos a partir de las dos horas de haber puesto el inóculo de *Streptococco agalactie* GB, en el LF y en el caldo de cultivo.

En la Gráfica 3, a las 2 y 4 horas posteriores a la inoculación de *Estafilococo* no hay acción inhibitoria puesto que la diferencia entre LF y el caldo de cultivo es menor de 2 logaritmos, sin embargo, a las 6, 12 y 24 horas, existe una acción inhibitoria franca.

En la Gráfica 4, se puede apreciar que la acción inhibitoria con más de dos logaritmos de diferencia se establece a partir de las 4 horas de observación.

En la Gráfica 5, de la diferencia significativa de inhibición bacteriana se establece sólo en las observaciones de las 12 y 24 horas con la inoculación de *Listeria monocitogenes*.

Por último, en la Gráfica 6, se puede apreciar que la *Candida a.* Fue inhibida en su crecimiento en LF sólo a las 12 y 24 horas y con una diferencia mayor de los logaritmos, pero bastante menor que con los otros gérmenes.

Finalmente para observación del comportamiento del crecimiento bacteriano en sus medios de cultivo específico, la influencia del LF en su desarrollo y el efecto distinto de éste entre cada uno de los microorganismos es apreciado en la Figura 1.

T A B L A S , G R A F I C A S

Y F I G U R A S

**CUENTAS VIABLES DE UFC/ml EN LIQUIDO FOLICULAR
EXPRESADAS EN ESCALA LOGARITMICA EN BASE 10
PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR**

MICROORGANISMOS	TIEMPO EN HORAS					
	0	2	4	6	12	24
E. Coli	8.29	2.47±1.01	2.42±1.45	0.85±1.43	2.40±1.11	2.36±1.04
Pseudomona A.	8.13	6.65±2.40	2.79±0.95	2.99±1.04	5.11±1.10	3.1 ±0.89
Streptococo G.B.	8.16	3.70±2.05	2.20±1.33	1.80±0.75	1.01±0.68	0.73±0.91
Estafilococo A.	8.8	7.33±2.45	7.22±2.12	3.73±1.94	3.67±1.67	2.75±2.01
L. Monocytogenes	8.13	6.0 ±1.85	6.30±2.04	8.01±2.24	2.0 ±1.19	0.8 ±1.04
C. Albicans	7.24	6.48±2.94	6.31±3.6	6.5 ±2.94	5.48±2.01	6.86±1.92

Tabla I

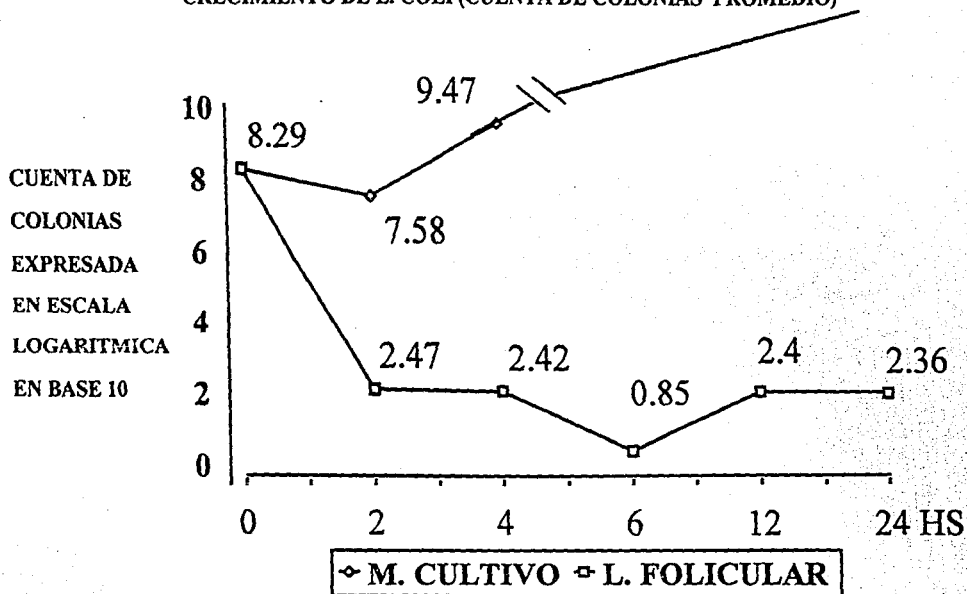
**CUENTAS VIABLES DE UFC/ml EN CALDO DE CULTIVO
(GRUPO CONTROL) EXPRESADAS EN ESCALA
LOGARITMICA EN BASE 10**

MICROORGANISMOS	TIEMPO EN HORAS					
	0	2	4	6	12	24
E. Coli	8.29	7.58	9.47*	9.47*	9.47*	9.47*
Pseudomona A.	8.13	7.94	9.47*	9.47*	9.47*	9.47*
Streptococo G.B.	8.16	8.52	9.47*	9.47*	9.47*	9.47*
Estafilococo A.	8.8	7.81	9.07*	9.47*	9.47*	9.47*
L. Monocytogenes	8.13	7.75	8.94	9.47*	9.47*	9.47*
C. Albicans	7.24	6.85	7.0	7.58	8.79	9.47*

* se consideraron cuentas viables "INCONTABLES" (mayor o igual a 3000×10^4 UFC/ ml) tomándose como base esta cifra y expresando su valor en escala logaritmica .

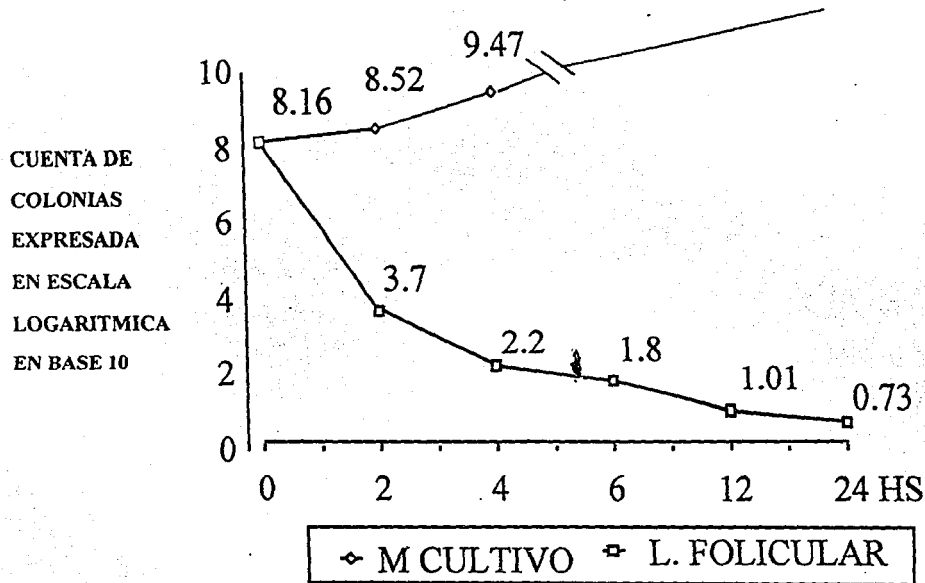
Tabla II

LIQUIDO FOLICULAR: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
CRECIMIENTO DE E. COLI (CUENTA DE COLONIAS PROMEDIO)



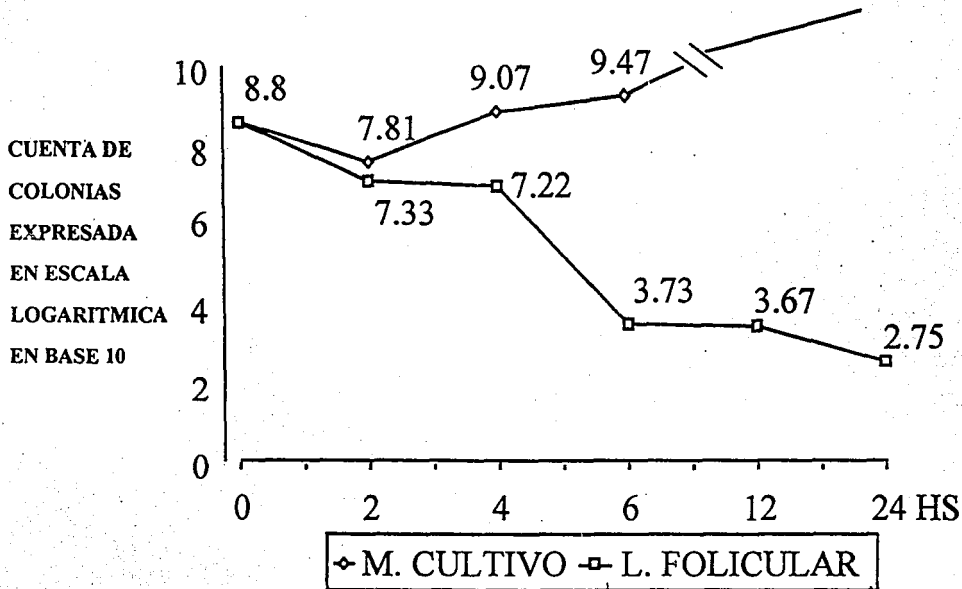
GRAFICA 1

LIQUIDO FOLICULAR: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
CRECIMIENTO DE ESTREPTOCOCO GRUPO B (CUENTA DE COLONIAS PROMEDIO)



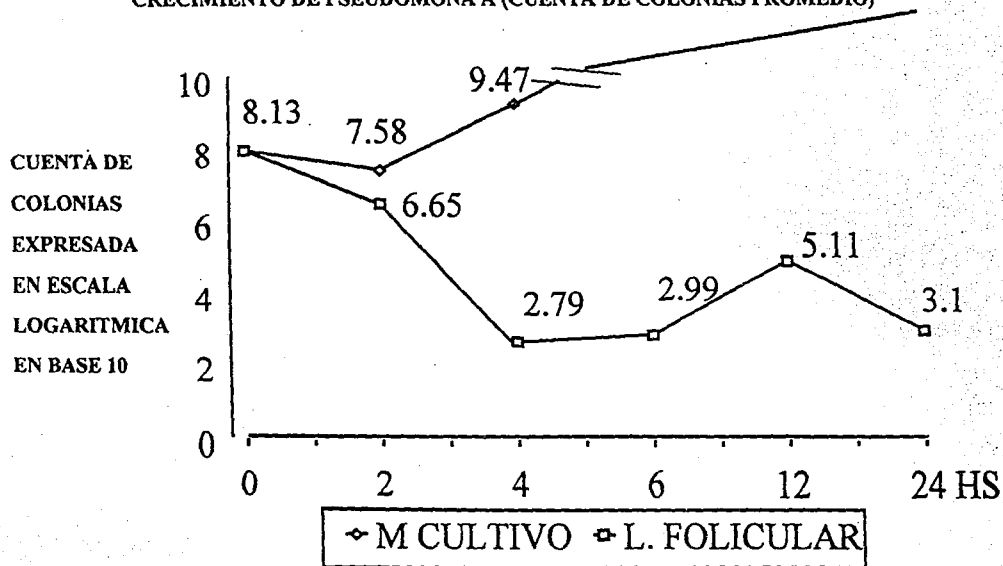
GRAFICA 2

LIQUIDO FOLICULAR: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
CRECIMIENTO DE ESTAFILOCOCO A (CUENTA DE COLONIAS PROMEDIO)



GRAFICA 3

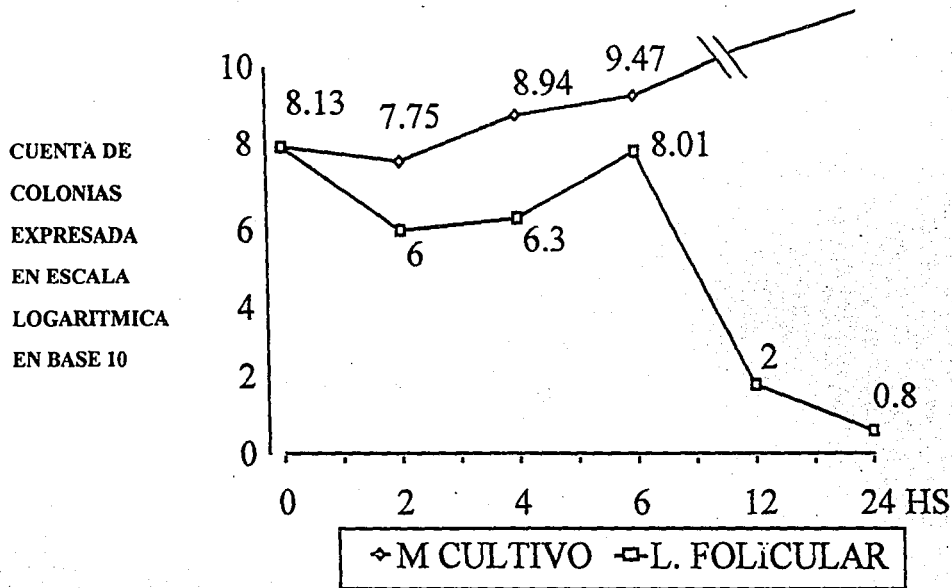
LIQUIDO FOLICULAR: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
CRECIMIENTO DE PSEUDOMONA A (CUENTA DE COLONIAS PROMEDIO)



GRAFICA 4

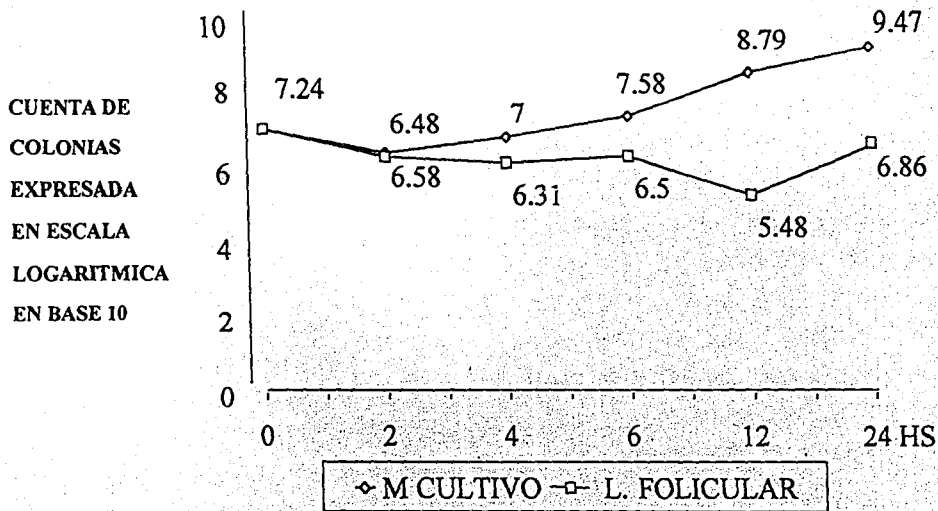
LIQUIDO FOLICULAR: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

CRECIMIENTO DE LISTERIA M. (CUENTA DE COLONIAS PROMEDIO)



GRAFICA 5

LIQUIDO FOLICULAR: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
CRECIMIENTO DE CANDIDA A. (CUENTA DE COLONIAS PROMEDIO)



GRAFICA 6

CONTEO DE COLONIAS EXPRESADO EN ESCALA LOGARITMICA EN BASE 10

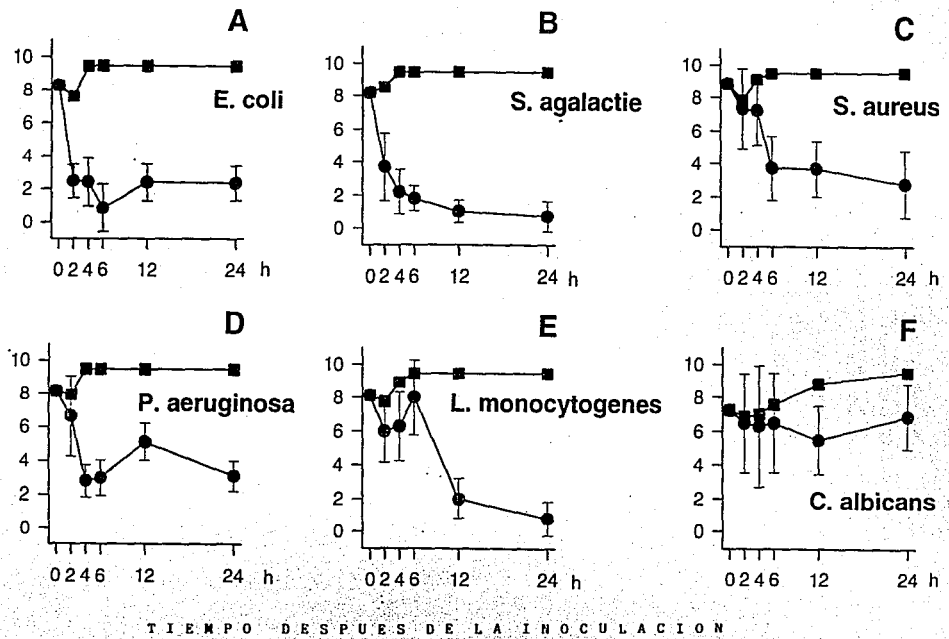


Fig 1. Líquido folicular: Actividad antibacteriana. Supervivencia de varios microorganismos, en Líquido Folicular (●) y en medio de cultivo (■).

DISCUSION

Hasta donde fue posible investigar, éste es uno de los primeros reportes en la literatura mundial que realiza un análisis formal acerca de ésta particular propiedad que el LF tiene. Aunque existen múltiples publicaciones acerca de la presencia de factores protéicos, enzimáticos, esteroideos en incluso quimiotácticos en el LF no hay ningún comunicado acerca de su evaluación antimicrobiana.

Como fue comentado, desde el punto de vista clínico llama la atención que un ovario multipuncionado en donde no pocas veces queda una superficie sangrante, no presente como otros órganos en tales condiciones, una respuesta manifestada por datos de infección, la anterior observación fue la que sirvió como hipótesis para la elaboración del presente trabajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede establecer que el líquido folicular ejerce una acción inhibitoria in vitro del crecimiento de los gérmenes inoculados siendo importante ésta acción en *Escherichia coli*, *Streptococos agalactie*, *Estafilococo aureus*, *Pseudomona aureuginosa* y más limitada en *Lysteria monocytogenes* y en *Candida albicans*.

¿Que implicaciones clínicas puede tener éstos hallazgos?

En primer lugar, se puede comentar que a pesar de los cuidados previos a la captura ovular, es posible llevar contaminación a los folículos puncionados, pues algunos de los líquidos foliculares tuvieron que ser excluidos del estudio por haber estado contaminados, lo cual refuerza la hipótesis de trabajo de éste estudio, en el sentido de que es posible que la acción probablemente bacteriostática del LF sea razón por la cual no se han presentado casos de infección en las pacientes sometidas a captura ovular para FIV-TE.

En segundo lugar, se conoce desde el punto de vista clínico que en las pacientes que tienen enfermedad pélvica inflamatoria (EPI), el último órgano que se ve afectado por una infección es precisamente el ovario y por lo tanto se puede postular que ante la presencia de EPI, a pesar de que el proceso de ovulación mensual fisiológico también queda una superficie cruenta y eventualmente sangrante. Es posible que ésta acción bacteriostática del LF sea la responsable de la defensa del folículo ante la infección. Para contestar a esta interrogante se iniciarán estudios con *Neisseria gonorrhoeae* y con *Chlamydia trachomatis* que son los gérmenes más frecuentes en la EPI.

Por otra parte, se debe tratar de identificar cual o cuales son los mecanismos responsables de ésta acción inhibitoria de los gérmenes inoculados in vitro y lo más probable es que pueden ser varios y no uno sólo. Es de comentar que en éste estudio

se tomó el pH de todos los líquidos, el cual fue neutro, por lo que no se puede establecer que el pH no tuvo influencia en la acción inhibitoria.

Debido a la facilidad para obtener LF en los programas de reproducción asistida, se ha incrementado de manera notable la determinación de diversas sustancias en el LF y aunque todos éstos reportes tratan de relacionar los hallazgos con diversos procesos de la función folicular como son la esteroidogénesis, maduración ovocítica, ruptura folicular, etc., es muy probable que también pueda participar en la acción de defensa contra gérmenes. Por ejemplo, la presencia de 5 a 15% de células que encuentra Loukides (24) en el LF son macrófagos, que si bien puede tener participación en la ruptura folicular y en la reabsorción del cuerpo amarillo, también puede ofrecer una acción antibacteriana. Así mismo, los reportes de citocinas como factor de necrosis tumoral, interferón gama e interleucinas que reporta Ben-Radael (10) involucradas en el proceso reproductivo, pueden ser capaces también de participar en la acción antibacteriana.

Igualmente Barak (27) reporta la presencia de interleucina 1 y factor de necrosis tumoral en el LF, Wang (28) la de interleucina 1 y 2, Perricone (46) y Castilla (25) describe las propiedades inmunosupresoras del LF. Aunque relacionados todos los reportes con las funciones foliculares de esteroidogénesis y ovulación, también puede estar eventualmente relacionadas con las actividades antibacterianas descritas en el presente trabajo.

puede estar eventualmente relacionadas con las actividades antibacterianas descritas en el presente trabajo.

Hacen falta muchos más estudios para aclarar todas las interrogantes que pueden plantear después de los resultados obtenidos en este trabajo sobre la actividad antibacteriana del LF y las evaluaciones de esos estudios pueden ayudar a entender mejor la fisiología folicular y eventualmente, modificar algunas de las técnicas utilizadas en la reproducción asistida. Sin embargo parece ser, en función de los resultados obtenidos en éste trabajo, que el líquido folicular tiene una acción antibacteriana, posiblemente selectiva, y que la prácticamente ausente comunicación de infecciones pélvicas post captura ovular esté influenciado por éste hallazgo en el cual en la Unidad de Reproducción Asistida del INPer, se mantiene como línea de investigación con el fin de ratificarlo y encontrar la (s) sustancias que proveen al LF de tal efecto.

BIBLIOGRAFIA

1. Adashi EY: The ovarian life cycle. En: Yen SSC, Jaffe RB: Reproductive Endocrinology. Thurd Edition. Saunders Co., Philadelphia, 1991; 181-237
2. Lipner H: Mechanism of mammalian ovulation. En: Knobil E, Neil JD: The physiology of reproduction. First Edition. Raven Press., New York, 1988; 447-488
3. Edwards RG: Follicular fluid. J Reprod Fert. 1974; 37: 189-219
4. Tarlatzis BC, y cols: Growth hormone, oestrdiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. Hum Reprod 1993; 8: 1612-16
5. De Sutter P, Dhont N, Vanluchene E, Vandekerckhove D: Correlations between follicular fluid steroid nalysis and maturity and cytogenic analysis of human oocytes that remained unfertilized after in vitro fertilization. Fertil Steril 1991; 55: 958-63
6. McClure N, Macpherson AM, Abberton KM, Healy DL, Rogers PAW: Human follicular fluid maturity and endothelial cell mitogenesis. Hum Reprod 1993; 8: 1564-69.
7. McClure N, y cols: Human follicular fluid maturity and endothelial cell chemotaxis. Hum Reprod 1994; 9: 1226-30
8. Giudice LC, Chandrasekher YA, Ctaldo NA: The potential roles of intraovarian peptides in normal and abnormal mechanisms of reproductive physiology. Curr Opin Obstet Gynecol 1993; 5: 350-59
9. Wang LJ, Normal RJ: Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid. Hum Reprod 1992; 7: 147-50
10. Ben-Rafael Z, Orvieto R: Cytokines-involment in reproduction. Fertil Steril 1992; 58: 1993-99

11. Fraser Y, Bair DT, Cockburn F: Ovarian venous blood PO_2 , PCO_2 and pH women. *J Reprod Fertil* 1973; 33: 11-17
12. Watanabe H, Nagai K, Yamaguchi N, Ikenoue T, Mori N: Concentration of interleukin-1 β correlates with prostaglandin E_2 and $F_2\alpha$ in human pre-ovulatory follicular fluid. *Hum Reprod* 1994; 9: 9-12
13. Shalgi R, Kraicer PF, Soferman N: Gases and electrolytes of human follicular fluid. *J Reprod Fert* 1978; 28: 335-43
14. Steegers-Theunissen RPM y cols: Study on the presence of homocysteine in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril* 1993; 60: 1006-10
15. Suchanek E, Simunic V, Juretic D, Grizelj V: Follicular fluid contents of hyaluronic acid, follicle-stimulating hormone and steroids relative to the success of in vitro fertilization of human oocytes. *Fertil Steril* 1994; 62: 347-52
16. Eriksen GV, Malmstrom A, Ulbjerg N, Huszar G: A follicular fluid chondroitin sulfate proteoglycan improves the retention motility and velocity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1994; 61: 8-23
17. Siitari JE, Dandekar P, Meizel S: Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J Exp Zool* 1988; 246: 71-80
18. Bar-Ami S, Khourry C, Zlotkin E, Brandes JM: Increasing progesterone secretion in human granulosa-luteal cells induced by human follicular fluid. *Hum Reprod* 1993; 8: 46-52
19. Schomberg DW, Mulherson GW: Transforming growth factors and ovarian function. En: Schomberg DW: Growth factors in reproduction. First edition. Springer-Verlag Co. New York, 1991: 79-90
20. Hiller SG y cols: Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 1206-11
21. Eden JA, Holly JMP, Alagband-Zadeh J, Carter GD, Jones J: Relationship between follicular fluid levels of insulin-like growth factor binding protein-1 and sex steroids from normal human ovarian follicles. *Gynecol Endocrinol* 1993; 7: 153-57

22. Conway GS, Jacobs HS, Holly JMP, Wass JAH: Effects of luteinizing hormone? Insulin, insulin-like growth factor-1, and insulin-like growth factor-1 Small binding protein 1 in the polycystic ovarian syndrome. *Clin Endocrinol* 1990; 33: 593-603
23. Cataldo NA, Giudice LC: Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with follicular functional status. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 821-29
24. Loukides JA y cols: Human follicular fluids contains tissue macrophages. *J Clin Endocrinol metab* 1990; 71: 1363-67
25. Castilla JA y cols: Immunosuppressive properties of human follicular fluid. *Fertil Steril* 1990; 53: 271-75
26. Byalos RP, Watson JM, Martinez-Maza O: Detection of interleukin-6 in human follicular fluid. *Fertil Steril* 1992; 57: 1230-34
27. Barak V y cols: The correlation of interleukin-1 and tumour necrosis factor to oestradiol, progesterone and testosterone levels in periovulatory follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Human Reprod* 1992; 7: 462-64
28. Wang LJ, Norman RJ: Concentrations of immunoreactive interleukin-1 and interleukin-2 in human preovulatory follicular fluid. *Human Reprod* 7: 147-50
29. Wang LJ, Brännström M, Robertson SA, Norman RJ: Tumour necrosis factor alpha in the human ovary: Presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production. *Fertil Steril* 1992; 58: 934-40
30. Sadatsuki M, Tsutsumi O, Sakai R, Eto Y, Hayashi N: Presence and possible function of activin-like substance in human follicular fluid. *Human Reprod* 1993; 8: 1392-95
31. Schneyer AL, O'Neil DA, Crowley WF Jr: Activin-binding proteins in human serum and follicular fluid. *Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1320-24
32. Pache T y cols: 17 β -oestradiol, Androstenedione and inhibin levels in fluid from individual follicles of normal and polycystic ovaries, and in ovaries from androgen treated female to male transsexuals. *Clin Endocrinol* 1992; 36: 565-71

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

33. Kamada S, Kubota T, Taguchi M, Aso T: High levels of immunoreactive endothelin-1 in human follicular fluids. *Human Reprod* 1993; 8: 674-77
34. Kobayashi T y cols: Detection of arginine esterase activity in human follicular fluid. *Hum Reprod* 1991; 6: 1030-33
35. Mahmood TA, Arumugam K, Templeton AA: Oocyte and follicular fluid characteristic in women with mild endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1991; 98: 573-77
36. Hemmings R y cols: Effect of follicular fluid supplementation on the in vitro development of human pre-embryos. *Fertil Steril* 1994; 62: 1018-21
37. Sasano H y cols: Immunolocalization of aromatase, 17 α -hydroxylase and side-chain-cleavage cytochrome P-450 in the human ovary. *J Reprod Fert* 1989; 85: 163-72
38. Tureck RW, Strauss JF III: Progesterone synthesis by luteinized human granulosa cells in culture: The role of de novo sterol synthesis and lipoprotein-carried sterol. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 367-75
39. Tellez MCJ, Wenz MA, Pascual A, García A, Manterola D: Maduración del ovocito y su relación con algunos componentes del líquido folicular. *Ginec Obstet Mex* 1994; 62: 107-12
40. Brenner RM, Maslar A: The primate oviduct and endometrium. En: Knobil E, Neil JD: *The physiology of reproduction*. First edition. Raven Press, New York 1988; 303-30
41. Saaranen MJ y cols: Acrosome reaction inducing activity in follicular fluid correlates with progesterone concentration but not with oocyte maturity or fertilizability. *Hum Reprod* 1993; 8: 1448-54
42. Blumenfeld Z, Nahhans F: Pretreatment of sperm with human follicular fluid for borderline male infertility. *Fertil Steril* 1989; 51: 863-68
43. Fakhi H, Vijayakumar R: Improved pregnancy rates and outcome with gamete intrafallopian transfer when follicular fluid is used as a sperm capacitation and gamete transfer medium. *Fertil Steril* 1990; 53: 515-20

44. Villanueva C, Vadillo F, Kably A, Diaz NA, Karchmer SA: Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil Steril* 1990; 54:1190-82
45. Vadillo F y cols: Factor quimiotáctico para espermatozoides: una nueva función biológica de la progesterona. *Ginec Obstet Mex* 1994; 62: 127-30
46. Perricone R y cols: Complement, complement activation and anaphylatoxins in human ovarian follicular fluid. *Clin Exp Immunol* 1990; 82: 359-62
47. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Koninckx PR, Vandeputte M: Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1993; 82: 206-12
48. Koninckx PR, Renaer M, Brosens IA: Origin of peritoneal fluid in women: and ovarian exudation product. *Br J Obstet Gynaecol* 1980; 87: 177-83
49. Bergam N, Bercovici B, Sacks T, Path FRC: Antibacterial activity of human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 114: 520-23
50. Galask RP, Snyder IS: Antimicrobial factor in amniotic fluid, *Am J Obstet Gynec* 1970; 106: 59-65
51. Gürgan T, Urman B, Diker KS, Delilbasi L, Kisinisci HA: Human follicular from pre-ovulatory follicles in patients undergoing in-vitro fertilization inhibits the in-vitro growth of Gram-positive micro-organisms. *Human Reprod* 1993; 8: 508-10