



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"RELACION ENTRE ALGUNOS COMPONENTES DEL
LIQUIDO FOLICULAR Y LA MADUREZ DEL
OVOCITO HUMANO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGA

PRESENTA:

THALIA SILVIA HUERTA PONCE



FACULAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. JUDITH TELLEZ MARTINEZ

MEXICO, D.F. 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



ACADEMIA DE CIENCIAS
EXACTAS Y FÍSICAS
UNAM

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

RELACION ENTRE ALGUNOS COMPONENTES DEL LIQUIDO FOLICULAR
Y LA MADUREZ DEL OVOCITO HUMANO.

realizado por THALIA SILVIA HUERTA PONCE

con número de cuenta 5900802 , pasante de la carrera de BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. EN C. JUDITH TELLEZ MARTINEZ

Propietario DRA. MARIA CRISTINA REVILLA MONSALVE

Propietario M. EN C. LEOBARDO CALZADA SANCHEZ

Suplente DRA. MARIA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL

M. del Carmen Uribe

Suplente DRA. GENOVEVA GONZALEZ MORAN

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Edna M. Suarez D.

Consejo Departamental de Biología
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	3
I. Introducción	
Antecedentes	5
II. Generalidades	
Ovogénesis	8
Factores endócrinos de la ovulación	
Reproducción asistida	
III. Hipótesis, objetivo y justificación	27
IV. Material y Métodos	28
Clasificación de los ovocitos al microscopio de luz	
Barrido espectrofotométrico	
Radioinmunoensayo de hormonas	
Determinación de proteínas	
Determinación de fosfatasa ácida	
Medio de cultivo	
Ovocitos	
V. Resultados y tablas	34
VI. Discusión	43
VII. Conclusión	46
VIII. Apéndices	47
Técnicas de Radioinmunoensayo	
Técnica para determinar proteínas (Lowry)	
Técnica para determinar fosfatasa ácida	
Medio de cultivo Ham F-10	
Prueba del significado de r	
IX. Tabla de abreviaturas usadas en el texto	55
X. Bibliografía	56

RESUMEN

La reproducción asistida consiste en una serie de metodologías o protocolos que permiten en la clínica médica estudiar y dar solución a algunos de los problemas de las parejas que presentan infertilidad, ayudándolas a concebir un hijo, cuando no se produce un embarazo de forma normal. Como parte de estas metodologías se ha establecido el uso de fármacos para inducir el crecimiento folicular múltiple, que asegura la ovulación de varios ovocitos por ciclo, con lo que se tienen mayores posibilidades de éxito en métodos como la fertilización "in vitro".

El desarrollo de metodologías especializadas para el manejo de ambos gametos se ha incrementado cada vez más; en el caso de los ovocitos se busca que un mayor número alcance la madurez y en la mayor parte de los laboratorios, ésta se evalúa a través del microscopio de luz, con base en sus estructuras morfológicas, como son el aspecto citológico del ovocito, de la zona pelúcida, de la corona radiada y del cummulus oophorus. Con base a estos datos se conoce que no todos los ovocitos recuperados después de un tratamiento de inducción se encuentran en el mismo estadio, pese a que proceden de un conjunto de folículos con crecimiento similar, además algunos de estos presentan un defasamiento entre el estado de evolución del núcleo del ovocito y las capas de células foliculares que lo rodean, lo que dificulta aún más su adecuada clasificación, de la cual depende el tiempo de incubación al que serán sometidos antes de ser inseminados. Una inseminación prematura ocasiona la falta de fecundación y segmentación.

El propósito de este estudio, fue localizar uno o varios marcadores que indiquen el estado real de madurez de los ovocitos humanos, obtenidos por inducción múltiple con la administración de gonadotropinas, en un programa de reproducción asistida.

Con base a estos antecedentes y con la finalidad de identificar uno o varios marcadores fisiológicos en ovocitos preovulatorios, en el presente estudio se analizan algunos de los parámetros bioquímicos del microambiente en el que éste se desarrolla y sus características morfológicas como son: el grado de expansión del complejo ovocito-corona radiada-cummulus (COCC), las características citoplásmicas y nucleares, y en el líquido folicular (Lf) las concentraciones de compuestos como fosfatasa ácida (F.ác), estradiol (E_2), hormona luteinizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH), y proteínas totales, además y con base a la coloración del Lf se midió la máxima absorbancia producida por el pigmento amarillo de éste, el cual presenta variaciones en intensidad y concentración de un folículo a otro aún en el mismo ovario.

Los Lf analizados correspondían a pacientes con problemas de infertilidad que fueron admitidas en dos de los programas de reproducción asistida del Hospital de Gineco Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" del IMSS. Uno de ellos es la transferencia intratubaria de Gametos conocida como GIFT (Gamete Intra Falopian Transfer) y el otro es la fertilización "in vitro" designada como FIV ó FIVTE (Fertilization In Vitro and Embryo Transfer).

Todas las pacientes fueron sometidas a un protocolo de inducción de la ovulación múltiple, para asegurar el crecimiento de varios folículos ováricos por ciclo, con la finalidad de tener mayores posibilidades de embarazo. Los folículos entre 20 y 24 mm fueron puncionados durante la laparoscopia y el líquido folicular aspirado fue analizado en el laboratorio para separar los ovocitos y retirar las células de la granulosa.

Los ovocitos se clasificaron en el microscopio de luz de acuerdo a sus propias características y las de las células que lo rodean. Los Lf se centrifugaron y congelaron hasta su análisis hormonal (LH, FSH, E₂), la determinación de proteínas y fosfatasa ácida, así como el barrido espectrofotométrico el cual se llevó a cabo en el rango de luz visible de 350 a 600 nm. Los Lf fueron agrupados de acuerdo a los picos de absorbancia localizados, formándose así tres grupos: a) Pico a 413.53 ± 2.50 nm, para ovocitos inmaduros; b) Pico a 456.80 ± 2.38 nm, para ovocitos maduros; c) Picos a 415.7 ± 1.23 nm y 455.17 ± 7.11 nm para ovocitos intermedios

Los datos obtenidos en cada una de las determinaciones fueron sometidos al análisis de variancia de Mann-Whitney y las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron por el análisis de correlación de Pearson utilizando el paquete estadístico Minitab versión 10, encontrándose correlaciones significativas entre un mayor número de parámetros en los componentes del Lf de ovocitos intermedios. Estos resultados, ayudan a clasificar de forma mas adecuada a los ovocitos, sin embargo, la mayor parte de las determinaciones bioquímicas son procedimientos que requieren de mucho tiempo para su desarrollo, por lo tanto, el barrido espectrofotométrico del Lf mostró ser una herramienta satisfactoria, fácil, reproducible y rápida, permitiendo clasificar de forma adecuada el estado de madurez del ovocito, por lo que es recomendable su uso en la clínica.

I INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Los descubrimientos hechos en los últimos 15 años en el campo de la medicina reproductiva, permiten ofrecer a parejas con problemas de infertilidad, métodos que les permitan lograr la concepción de un hijo en condiciones en las que antes jamás hubiera sido posible lograrlo.

Se entiende por infertilidad, la falta de concepción de una pareja que ha tenido relaciones sexuales durante un año sin el uso de anticonceptivos y que no ha logrado tener un embarazo (Di Paola 1992). La infertilidad puede tener diversas causas, pudiendo ser de tipo fisiológico (endometriosis, poliquistosis ovárica, problemas inmunológicos, falla ovárica, enfermedades genéticas etc.), anatómico (tabique uterino, criptorquidea, presencia de adherencias etc.), traumático (pérdida ovárica o de testículo, ausencia de útero), endócrino (hiperprolactinemia, anovulación, ovario poliquístico) o psicológico (estrés, ejercicio, drogas, nutrición) afectando a uno o a los dos cónyuges. Un factor determinante también puede ser la edad, ya que en la actualidad un mayor número de parejas se estabilizan después de los 30 años y planean la concepción pasados los 35 años, momento en el que el declive en la producción hormonal se inicia en la mujer (Rotsztein, 1992; Asch, 1992; Wallach, 1988).

Desde la introducción de la fertilización "in vitro" como un tratamiento para resolver los problemas de infertilidad, se ha producido un desarrollo exponencial de técnicas como son los procedimientos en la inducción de la ovulación, micro-inyección de espermatozoides bajo la zona pelúcida, biopsia de embrión, diagnóstico de preimplantación, criopreservación, análisis ultraestructural de gametos y embriones, estudios del tracto reproductor femenino y su receptividad.

El primer éxito en fertilización "in vitro" y transferencia de embriones descrito por Edwards y Steptoe en 1978, dió inicio al desarrollo de metodologías e investigaciones orientadas al área de la biología de la reproducción humana (Calderón, 1993). La FIV fue inicialmente un tratamiento para corregir factores severos de infertilidad mecánicos, pero fue rápidamente utilizado en otras áreas en el campo de la infertilidad como son infertilidad de causa no explicada, factor de infertilidad masculino, infertilidad inmunológica, endometriosis, infertilidad por factor cervical y aún fallas ováricas (Bonilla, 1992).

Louisa Brown fue la primera bebé "de probeta" nacida de un procedimiento de FIV, a partir de un ovocito obtenido de un ciclo natural, después del fracaso de muchos ciclos. En estos primeros protocolos el éxito fue muy bajo debido a que un solo ovocito madura por ciclo (Rossavik, 1985), por lo que el desarrollo de otro tipo de protocolos se hizo necesario y fue el grupo de la Universidad de Monash el primero en reportar el desarrollo de un mayor número de folículos por ciclo, usando para ello un protocolo de estimulación en el que se utilizó citrato de clomifén (C.C.) y Gonadotropina Menopausica humana (hMG) (Trousnon, 1981). La fertilización "in vitro" y la transferencia intratubaria de gametos, están consideradas como técnicas eficaces y bien conocidas para el tratamiento de la infertilidad.

Los ovocitos se obtienen puncionando y aspirando los folículos antrales ya sea mediante un acto quirúrgico denominado laparoscopia, o bien mediante ultrasonido transvaginal, 36 horas después del aumento sérico de LH, siendo necesario un análisis continuo de esta hormona para programar la cirugía o bien la captura transvaginal, y en el caso de reproducción asistida, la hCG (Gonadotropina Coriónica humana), se administra de forma programada simulando la elevación artificial de LH, para tener posteriormente un horario accesible para la paciente y para el equipo médico.

Desde 1984 se han realizado estudios detallados sobre la administración programada con diversos fármacos que permitan lograr ciclos mas estables con ovocitos de mejores características. Los diferentes grupos dedicados a reproducción asistida, han desarrollado sus propios programas en los que el registro continuo del crecimiento folicular por ultrasonido, es seguido por el análisis hormonal sérico diario de E_2 , de LH del ovario de las pacientes, a partir del noveno día del ciclo, siendo estos resultados los indicadores que dan la pauta para alargar o acortar los programas o para recurrir a otro protocolo de inducción con el que se obtenga una mejor respuesta (Pellicer, 1992).

En general con los procedimientos de inducción de la ovulación, se consigue el crecimiento de muchos folículos, sin embargo, no todos presentan el mismo grado de madurez del ovocito. Existen muchos estudios en torno al desarrollo folicular múltiple y al defasamiento en la maduración de las diferentes capas que rodean al ovocito y su relación con la fecundación, formación de pronúcleos, segmentación e implantación, para llegar al nacimiento de un bebé vivo (Lopata, 1989; Hill, 1989; Rabinovici, 1989; Asch, 1992). La correcta valoración de la madurez del ovocito en el momento de su captura, resulta de gran importancia para asegurar su fertilización normal y su desarrollo posterior; una evaluación incorrecta puede llevar a la inseminación prematura o tardía del mismo, produciendo como consecuencia una fertilización fallida o anormal.

Los ovocitos inmaduros inseminados antes de entrar en la metafase II pueden ser penetrados por espermatozoides, pero no están en condiciones de iniciar los procesos que conducen a la descondensación de la cromatina del espermatozoide, por lo que no se formarán los pronúcleos masculinos. Puede ocurrir también que si los ovocitos son inseminados en estado inmaduro o postmaduro, aparezcan tres o cuatro pronúcleos. En los ovocitos inmaduros el número de gránulos corticales es menor y su respuesta a la penetración del primer espermatozoide puede ser inadecuada, penetrando mas espermatozoides de lo normal provocando polispermia, mientras que en los postmaduros puede resultar inhibida la liberación de los gránulos corticales y/o la penetración en la zona pelúcida puede ser poco funcional (Lopata, 1983; Dandekar, 1984; Laufer, 1984; Seibel, 1989).

Para lograr el requisito de la madurez nuclear, es necesario someter a los ovocitos a un periodo de incubación en medio de cultivo F10 mas o menos prolongado hasta visualizar la liberación del primer cuerpo polar, y lograr que desarrolle la capacidad citoplásmica para dividirse, por lo que resulta de gran importancia determinar el momento apropiado para la inseminación. En la actualidad el análisis morfológico al microscopio es uno de los procedimientos mas utilizados para determinar el estado de madurez del ovocito, por el tiempo y el mínimo equipo para hacerlo, mientras que las pruebas bioquímicas no siempre están al alcance de los laboratorios para dar un resultado rápido.

Con los procedimientos de estimulación ovárica, que resultan cada vez más complejos, se encuentran ovocitos en diferentes estadios y debido a que el tiempo es un factor esencial, se deben utilizar métodos rápidos y efectivos para asegurar que se ha alcanzado la madurez meiótica antes de la inseminación (Veeck L.L, 1992).

Actualmente, se han logrado considerables mejoras técnicas en los distintos pasos de la inseminación extracorporea, una de éstas son los esquemas de inducción de la ovulación con los que se ha incrementado el número de ovocitos por ciclo, lo que permite ayudar a las mujeres en algunos problemas específicos (Di Paola, 1992).

Otra de las áreas que se ha mejorado, es el manejo de las muestras de semen, que han originado el desarrollo de nuevas metodologías para capacitar "in vitro" a los espermatozoides y obtener mejores resultados durante la fertilización.

La finalidad de todas estas metodologías es favorecer el contacto entre los gametos masculino y femenino, con la capacidad de fecundar y de segmentar, lo que se hace posible en el FIV, tras la preparación de un eyaculado con características poco prometedoras en la producción de espermatozoides, (escasos, con poca movilidad, anormales, etc), en el momento idóneo y en un medio semejante al tubario y así mejorar las posibilidades de éxito.

II GENERALIDADES

OVOGÉNESIS

Los ovarios de los mamíferos son órganos pares altamente complejos encargados de: la producción de gametos femeninos (ovocitos), durante la vida reproductiva de las hembras; la secreción de hormonas esteroideas específicas, como son los estrógenos y la progesterona, esenciales para todos los eventos sexuales que ocurren dentro del tracto genital femenino (ciclo estral, ciclo menstrual y embarazo) y la regulación hormonal del crecimiento postnatal de los órganos reproductores, así como el desarrollo de las características sexuales secundarias.

El ovario está formado por una corteza y una zona interna o médula, ambas formadas por estroma de tejido conectivo. El estroma de la corteza está formado por tejido conectivo denso, rico en células, mientras que el estroma de la médula es un tejido conjuntivo laxo, con nervios, vasos sanguíneos y linfáticos que entran y salen del ovario via el hilio. Estos tejidos del ovario tienen su origen exclusivamente en la cresta gonadal germinal, mientras que las células sexuales u ovocitos tienen un origen extraembrionario (Moore, 1989).

En la corteza del ovario se encuentran numerosos folículos pequeños que contienen ovocitos en estado latente, así como un número reducido de folículos grandes. Durante cada ciclo estral o mensual, un número variable de folículos entran a un rápido crecimiento y desarrollo que culmina con la ovulación. En el humano solo un ovocito o excepcionalmente más maduran por ciclo, mientras que en otros mamíferos se presenta ovulación múltiple (Van Blerkom, 1979).

Los folículos humanos al inicio de su crecimiento miden aproximadamente 25 a 50µm de diámetro y contienen un ovocito de aproximadamente 15 a 30µm. Estos ovocitos son de origen extraembrionario y han emigrado como células germinales primordiales desde el epiblasto pasando por el mesenterio dorsal en su camino hacia arriba, hasta llegar a implantarse en la corteza de la cresta genital embrionaria. Estas células inician su migración hacia el final de la tercera semana de desarrollo embrionario ayudadas por movimientos ameboides, pues se ha observado la presencia de pseudópodos que les ayudan en su migración, estimuladas por fibronectina que aporta la sustancia adhesiva que necesitan las células germinales primordiales a lo largo de su ruta y por una gran cantidad de material enzimático presente en sus lisosomas que les ayuda a digerir los tejidos por los cuales atraviesan hasta llegar a localizarse en la gónada (Merchant, 1978, 1979).

En la especie humana, hacia el final de la cuarta semana y comienzo de la quinta, llegan las células germinales primordiales a la cresta genital, iniciándose la diferenciación gonadal donde los gonocitos se transforman en ovogonias, sufriendo varias divisiones mitóticas y hacia el final del tercer mes, se disponen en acúmulos rodeados por una sola capa de células irregulares aplanadas, las cuales se considera que se originan del epitelio celómico o germinal que recubre al ovario. Las células de la teca y las células intersticiales se originan en la médula ovárica (Hafez, 1987). Estas estructuras se denominan folículos primordiales y se encuentran separados del estroma por una delgada lámina basal, la cual se incrementa en grosor durante los siguientes estadios foliculares, que pueden ser divididos para la comodidad de su estudio en estadio prefolicular y folicular.

Durante este período las células germinales u ovogonias y las células de soporte derivadas del estroma gonadal y del mesonefros, se disponen en cordones y láminas dentro de la corteza del ovario. En el ovario fetal las ovogonias aparecen como células de aspecto esférico con un nucleolo prominente y la cromatina se encuentra en forma de gránulos uniformemente distribuidos, distinguiéndose fácilmente de las células de la granulosa.

Las ovogonias se transforman en ovocitos con el inicio de la meiosis, la cual se piensa que es regulada por una sustancia inductora producida en la rete ovarii fetal (Byskov, 1979). La formación de folículos se inicia al final del quinto mes de vida intrauterina hasta alcanzar un número considerable de alrededor de 7,000,000; sin embargo en este momento, da inicio un proceso gradual de degeneración celular, que provoca la pérdida de muchas ovogonias, por lo que hacia el séptimo mes, la mayor parte de las ovogonias han degenerado y las que sobreviven se transforman en ovocitos primarios. Durante el paquíteno, se presenta otra reducción de ovocitos y otra mas en el estadio de diplóteno, hasta que se reducen aproximadamente a dos millones en el momento del nacimiento (Gráfica 1), por lo que se calcula que en las primeras semanas de vida extrauterina el ovario dispondrá de alrededor de uno a dos millones de folículos primordiales o aún menos (Gondos, 1970).

La meiosis es una variedad de división celular especial, que consiste de dos divisiones celulares sin interfase entre ellas, cada una incluye los estadios de profase, metafase, anafase y telofase, dando por resultado cuatro células haploides, es decir, con un solo juego de cromosomas los que previamente han realizado su intercambio genético. En los mamíferos este proceso se inicia durante el desarrollo fetal temprano, progresa a través de la vida fetal o período neonatal, y queda detenido en la primera profase de la meiosis completándose en el estado adulto al momento de la ovulación y fertilización de la ovátida.

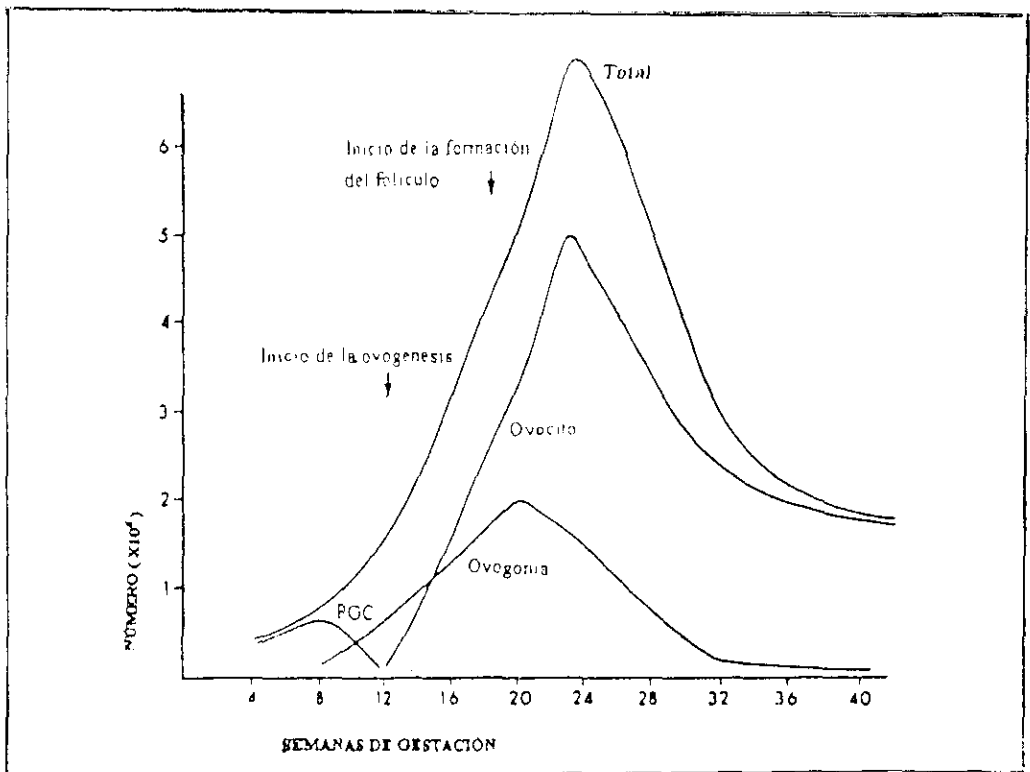
La secuencia completa de eventos por los cuales la ovogonia se transforma en ovocito maduro es conocida como ovogénesis. Las ovogonias proliferan por divisiones mitóticas y crecen hasta formar ovocitos primarios, que inician su primera división meiótica con una profase especial que se inicia con el preleptóteno y leptóteno, donde los pares homólogos de cromátidas hermanas, se unen como delgadas fibras que se acercan y emparejan quedando uno (de origen materno), frente al otro (de origen paterno) formando una sinapsis, estructura característica de las células que entran en meiosis. En la siguiente etapa llamada cigóteno, cada par bivalente condensa su cromatina aún más, haciéndose los cromosomas mas cortos y gruesos. En el paquíteno, se realiza el intercambio genético, en diferentes puntos de los cromosomas formándose el complejo sinaptonemal. En el periodo de dictióteno, hay una separación de los cromosomas homólogos, aun cuando esta separación no es completa, permaneciendo unidos por áreas de intercambio o quiasmas en donde se llevó a cabo la recombinación entre segmentos que codifican para un mismo gen.

Esta fase de la meiosis permanece así por varios años en el ovocito, hasta que puede continuar su división y se le conoce como tétradas características del dictióteno. Las células que rodean al ovocito primario, secretan una sustancia llamada inhibidor de la maduración del ovocito (OMI) que impiden que continúe este proceso. Algunos ovocitos continúan su división en la etapa puberal, mientras que otros tienen que esperar hasta el final de la vida reproductiva de la especie.

Una vez que se reanuda el proceso, sigue la etapa de diacinesis que se caracteriza por la separación de las tétradas con lo que se completa el final de la profase I, en la cual los cromosomas tienen el máximo grado de separación; sigue la metafase I con la formación de la placa ecuatorial de cromosomas, durante la anafase I se separa un representante de cada par desplazándolos a cada polo celular y en la telofase I cada célula tiene un número haploide de cromosomas.

La separación de citoplasma en las dos células hijas es desigual, el ovocito secundario recién formado contiene la mayor parte del citoplasma, mientras que el primer cuerpo polar casi no tiene y pronto degenera. Al ocurrir la ovulación, el núcleo del ovocito secundario inicia su segunda división meiótica sin interfase, pasando por profase II y metafase II en donde se detiene nuevamente.

En la especie humana para que la meiosis continúe tiene que penetrar el espermatozoide, y desencadenar la anafase y telofase II, que produce dos células haploides de diferente tamaño, la mayor parte del citoplasma queda en el ovocito, formándose el segundo cuerpo polar que es pequeño (Langman, 1986; Moore, 1988; Alberts, 1989).



GRAFICA 1.- Número de células germinales en ovario fetal, correlacionado con la edad gestacional Tomada de "Handbook of human Growth and developmental Biology" Calderón, 1993

FACTORES ENDÓCRINOS DE LA OVULACIÓN

Los mecanismos involucrados en la regulación de la ovogénesis en el ovario prefolicular son desconocidos, la producción hormonal es irregular y se establece de forma cíclica hasta la etapa de la adolescencia. Kaplan en 1976 demostró que la hipófisis fetal de embriones entre 10 y 11 semanas de gestación, podía sintetizar gonadotropinas inclusive antes del inicio de la ovogénesis; sin embargo en investigaciones "in vitro" en el ovario fetal humano, no se encontró influencia de estas hormonas en el desarrollo de los ovocitos. En monos la hipofisectomía fetal produce reducción en el número de ovocitos, lo que sugiere un efecto temprano de las gonadotropinas en el desarrollo del ovario de esta especie (Hafez, 1987).

El crecimiento y maduración de los folículos en el ovario y la ovulación, son eventos que dependen en forma íntima de la esteroidogénesis, además de mecanismos de control neuroendócrino involucrados con la secreción de gonadotropinas. Estos procesos actúan en concierto para producir una secuencia ordenada de eventos endócrinos, morfológicos y fisiológicos que en el humano conocemos como ciclo menstrual.

El crecimiento del folículo es controlado por mecanismos endócrinos, parácrinos y autócrinos; en los endócrinos, la maduración folicular está determinada por la secreción de gonadotropinas en la pituitaria; en los parácrinos el control es un proceso local producido por péptidos y esteroides llamadas parahormonas, secretadas por el ovario mismo y modulan la respuesta folicular a la estimulación de las gonadotropinas y finalmente en los autócrinos, el control toma lugar en la célula, en donde el producto de una célula modula la síntesis de otro producto de la misma célula, como en el caso de los estrógenos que incrementan en las células de la granulosa la producción de receptores para FSH y LH (Danforth, 1995).

Cada folículo aumenta su tamaño de 25 hasta 200 μ m por multiplicación de las células de la granulosa que se hacen cúbicas y forman varias capas alrededor del ovocito, debido al estímulo de la hormona foliculo estimulante, secretada por las células β de la pituitaria anterior bajo el control de las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH), producidas por el hipotálamo. La FSH es una molécula que contiene un complejo carbohidrato-proteína con un peso molecular de aproximadamente 28,000 daltons, formada por dos cadenas de polipéptidos designados como α y β . La cadena α de FSH, LH, y hCG es bioquímicamente idéntica, mientras que la cadena β es única y le confiere especificidad biológica e inmunológica específica; la bioactividad también se determina por su cadena β . La FSH facilita el desarrollo y mantenimiento del tejido gonadal que sintetizan y secretan estrógenos y en presencia de éstos se inicia la síntesis y expresión de las aromatasas. No todos los folículos tienen la misma cantidad de receptores para FSH que es intermediaria en la producción de estrógenos, obligando a los folículos con menor capacidad esteroidogénica a sufrir una regresión o atresia (Adams, 1993).

La secreción de estradiol al plasma sanguíneo es variable a lo largo del ciclo menstrual, siendo de alrededor de 30 a 150 pg/ml durante la fase folicular temprana, de 150 a 500 pg/ml en la fase preovulatoria y de 30 a 200 pg/ml en la fase lútea.

En sus etapas iniciales el folículo se aproxima al estroma del ovario que está más vascularizada aumentando la estructura enzimática que producirá la síntesis de esteroides y por tanto aumentará su actividad hormonal. La zona encargada de esta actividad es un tejido que rodea al ovocito por fuera de las células de la granulosa, que recibe el nombre de teca, en el que se diferencia una zona externa fibrosa acelular, y una zona interna vascularizada cuyas células tecales presentan un retículo endoplásmico liso notable, así como mitocondrias con crestas tubulares, mientras que el ovocito permanece creciendo en etapa de dictiótenuo.

Durante el crecimiento folicular se forma alrededor de los ovocitos una cubierta de material amorfo, fibrilar, constituido principalmente por glicoproteínas de diferente peso molecular, (ej. Glicosamino-glicanos como la N-acetilglucosamina) polipéptidos, oligosacáridos y otros componentes, denominada zona pelúcida (ZP); las funciones de esta zona son: proteger al ovocito; contener receptores especie-específicos para reconocer a los espermatozoides involucrados en la fertilización; servir como una barrera o bloqueo para evitar la polispermia (estableciéndose una barrera, por medio de enzimas producidas en los gránulos corticales en respuesta a la fertilización de un espermatozoide) y proteger al embrión en desarrollo, mientras atraviesa por la primera porción del tracto reproductor femenino (Kaufman, 1989).

El origen de la zona pelúcida ha sido muy controvertido, los estudios realizados en huevos de algunos mamíferos, sugieren que esta zona proviene de las células de la granulosa que rodean al folículo, aunque estudios autorradiográficos usando N-acetilglucosamina ^3H demuestran que el origen está en el ovocito; en otras especies este producto se encuentra en ambos compartimentos, sin embargo, en la especie humana la respuesta a este hecho aún no es muy clara (Wassarman, 1988).

Algunos autores (Wassarman 1988, Kaufman 1989), han reportado que la zona pelúcida se encuentra formada por varias subzonas, cuya composición molecular es variable, y se describen como dos, tres y hasta cuatro diferentes variaciones en el patrón de glicoproteínas denominadas: ZP1, ZP2, ZP3 y hasta ZP4 (en el cerdo o en el ratón).

La zona pelúcida no es una área homogénea, se encuentra penetrada por finas prolongaciones citoplásmicas de células foliculares y por microvellosidades que sobresalen del ovocito, gracias a éstas es posible el transporte de sustancias indirectamente desde el torrente circulatorio hasta el ovocito durante todo el período de su desarrollo.

El crecimiento de los folículos está asociado con cambios en el ovocito, el cual presenta aumento de tamaño con base a síntesis de ADN y proteínas y aumento en el número de capas de células de la granulosa, así como la formación de líquido folicular (Lf), que se va acumulando en pequeñas áreas entre las células de la granulosa, que al coalescer forman una cavidad llamada antro.

Se ha demostrado por pruebas citoquímicas que existen diferencias en las células de la granulosa de la periferia (murales), las células de la granulosa periantrales (que dan forma al antro folicular) y la granulosa que forma el cumulus oophorus (Amsterdam, 1992).

De acuerdo a las características histológicas y citológicas los folículos pueden ser clasificados en :

1.- Foliculo primario, pequeño, sin crecimiento, en el cual, el ovocito esta rodeado por una sola capa de células de la granulosa cúbicas, unidas por proyecciones membranales llamadas desmosomas y por adherencias zonales que son canales transmembranales que poseen un polo hidrofílico, a través de los cuales pasan los nutrientes de una célula a otra hasta el ovocito. Estos folículos están localizados en la corteza ovárica, rodeados por células estromales (Weisen, 1993; Wasserman, 1994).

2.- Foliculo preantral o secundario, cuyo ovocito inicia su crecimiento y está rodeado de una zona pelúcida bien desarrollada y de varias capas de células de la granulosa en proliferación (entre 2 a 12 capas) y una o varias capas de células de la teca. En los folículos más grandes empiezan a aparecer pequeños espacios intercelulares, producidos por la acumulación de líquido folicular (Greenwald, 1977).

3.- Foliculo antral, terciario o de Von Graaf, en el cual el ovocito ha terminado su crecimiento, mientras que el resto de la estructura continúa alargándose aumentando la producción del fluido por las células de la granulosa así como de la síntesis de prostaglandinas esenciales para la ruptura del foliculo (Lipner, 1988) y la formación de una cavidad llamada antro la cual se hace cada vez mayor hasta dejar al ovocito flotando en el centro y sostenido a una de las paredes del foliculo por una prolongación de células de la granulosa llamada cumulus oophorus, que se va haciendo cada vez mas delgada para permitir la liberación del ovocito al madurar y ovular.

Para este periodo, el foliculo maduro, se acerca a la superficie del ovario llegando al estadio preovulatorio, y el ovocito que hasta entonces permanecía en su estadio de dictióteto, reanuda y completa su primera división meiótica, dando lugar a dos células de diferente tamaño, la mayor, se convierte en ovocito secundario y la pequeña es conocida como primer corpúsculo polar (GP). Hacia el final de este periodo, el cumulus se encuentra completamente separado y flota libremente en el líquido folicular; en la superficie del ovario se inicia un debilitamiento de la pared ovárica y comienza a mostrar un abultamiento local, en cuyo vértice aparece una mancha avascular llamada estigma, que marca la localización del sitio por donde se romperá el foliculo en el momento de la ovulación (Okamura, 1980).

4.- Foliculo atrésico, presenta cambios degenerativos que se pueden presentar en cualquiera de las etapas de desarrollo folicular, y que van desde cambios en la morfología del ovocito incluyendo degeneración y desprendimiento de la capa de la granulosa, presencia de núcleos picnóticos en estas células, hasta aumento en la producción de progesterona con una concomitante disminución de estrógenos (Hughes, 1991). La atresia puede ser sutil o claramente evidente con granulosa totalmente degenerada y flotando en el Lf (Hussein, 1976). La atresia es un fenómeno en estudio; hasta el momento son varias las causas que se sugiere la ocasionan, entre las cuales se cuentan: deficiencias circulatorias y nutricionales, factores inmunológicos, cambios en los patrones enzimáticos del foliculo, factores de crecimiento, producción de hormonas etc. (McNatty, 1979; Maxson, 1985) (Figura 1).

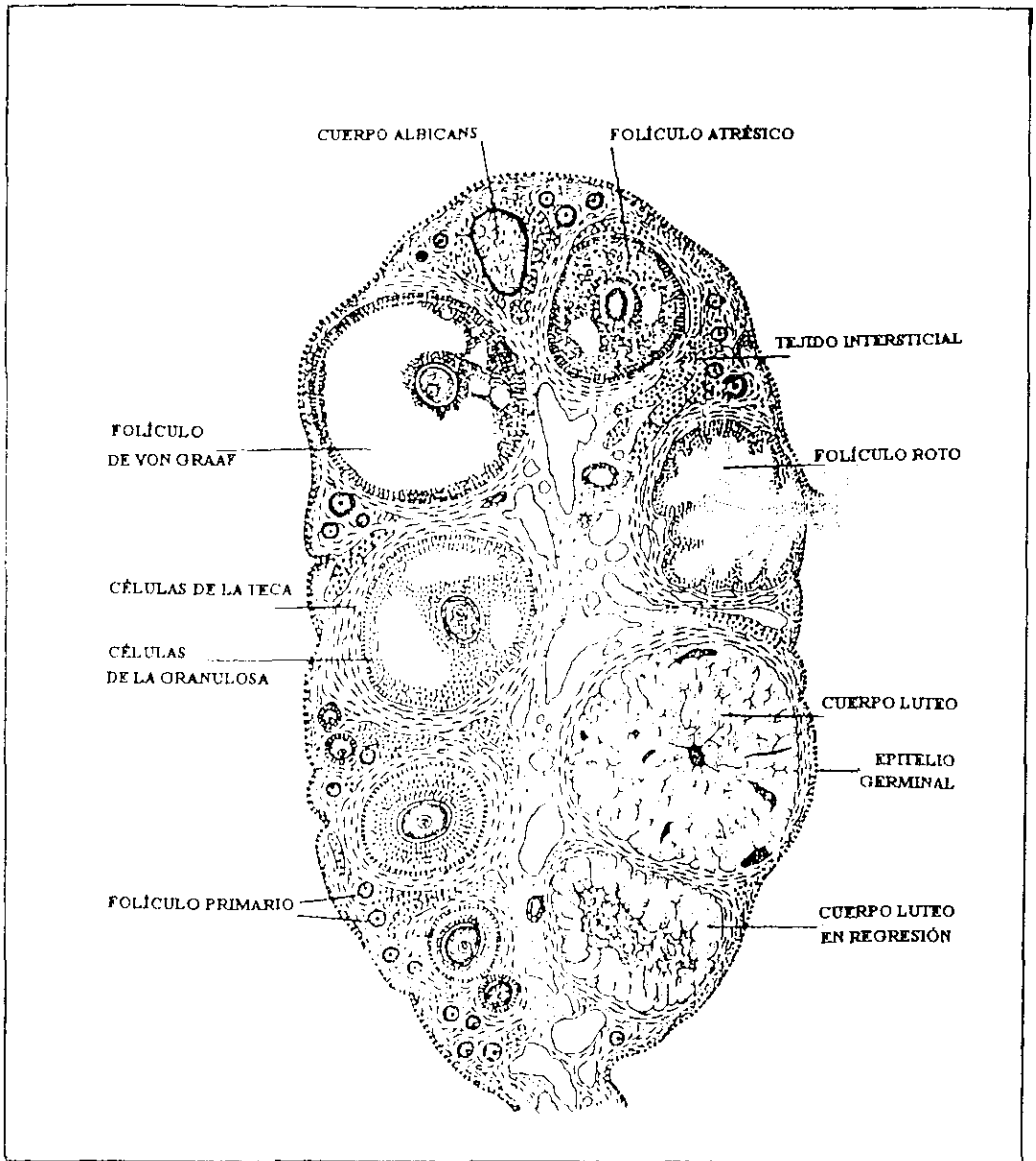


FIGURA 1.- Esquema que muestra los diferentes estadios de los folículos y ovocitos en el ovario durante su crecimiento. Baker T. G.: Oogenesis and ovulation en *Reproduction in mammals* | Germ Cells and Fertilization ed. C.R. Austin & R. V. Short, 1972; 2: 40.

Biosíntesis de las hormonas esteroideas en el ovario

Las hormonas esteroideas femeninas, producidas en el ovario, son fundamentalmente los estrógenos y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona, testosterona y 17α hidroxiprogesteroona.

Estrógenos. Los estrógenos son esteroideas de 18 átomos de carbono con el anillo A fenólico y suponen el último eslabón en la cadena biosintética esteroidea; se forman por aromatización de los andrógenos. El 17β -estradiol, es el estrógeno natural más potente; es una hormona esteroide con un peso molecular de 272.4. Desde el inicio de la pubertad el ovario es la única glándula capaz de producir cantidades significativas de estrógenos. Las glándulas suprarrenales y el testículo, también pueden aromatizar andrógenos C_{19} a estrógenos, pero su capacidad es muy reducida (Figura 2).

Dentro del folículo, para la biosíntesis del E_2 se necesita la interacción entre las células de la teca interna y las células de la granulosa (Teoría de las dos células dos hormonas de Makris y Ryan, 1975).

Las células de la teca interna son esteroideogénicas, sin embargo no tienen la totalidad de enzimas necesarias para formar el E_2 , carecen casi completamente de aromatasas que permitan el paso de andrógenos a estrógenos; por otra parte las células de la granulosa, también están facultadas para la producción de esteroideas pero carecen de los sistemas enzimáticos que permitan el paso de los progestágenos a andrógenos, por lo tanto, es una colaboración entre las células de la teca y las células de la granulosa lo que permite la biosíntesis de estradiol, a través de enzimas como son: el citocromo P450, la aromataasa y la 17β -hidroxiesteroide dehidrogenasa (17-HSD). La P450 y la aromataasa son responsables de la conversión de andrógenos a estrógenos catalizando una serie de reacciones que producen la formación de un anillo fenólico, mientras que la 17-HSD cataliza la interconversión reversible del 17-hidroxi y 17-cetoesteroideas.

El resultado de algunos estudios ha mostrado que la expresión de la P450 y la aromataasa en el ovario están relacionadas con el estadio de desarrollo folicular (Ghersevich, 1994). Esta colaboración está modulada por los niveles de FSH que actuando sobre sus receptores localizados en las células de la granulosa, estimulan la aparición de aromatasas o bien, inhiben a un inhibidor de la aromatización, permitiendo que las aromatasas funcionen y se produzca la cantidad suficiente de E_2 (Figura 3).

El E_2 es secretado cíclicamente por las células de la granulosa, las del folículo maduro y después de la ovulación por el cuerpo luteo. Durante el embarazo, el E_2 y otros estrógenos son producidos en cantidades que se incrementan por la placenta, cuando ésta está a término su secreción es mayor que en cualquier otro momento y los niveles caen abruptamente después del parto. En la menopausia la secreción decrece a muy bajos niveles y la mayoría de los estrógenos presentes son derivados de andrógenos adrenales, sin embargo los ovarios contribuyen con una pequeña cantidad por algunos años. Los estrógenos son transportados por proteínas de enlace a la circulación, una parte importante de ellos queda en el Lf para propiciar el crecimiento del folículo, estimulando la división mitótica en células de la granulosa y el crecimiento del ovocito (Maxson 1985).

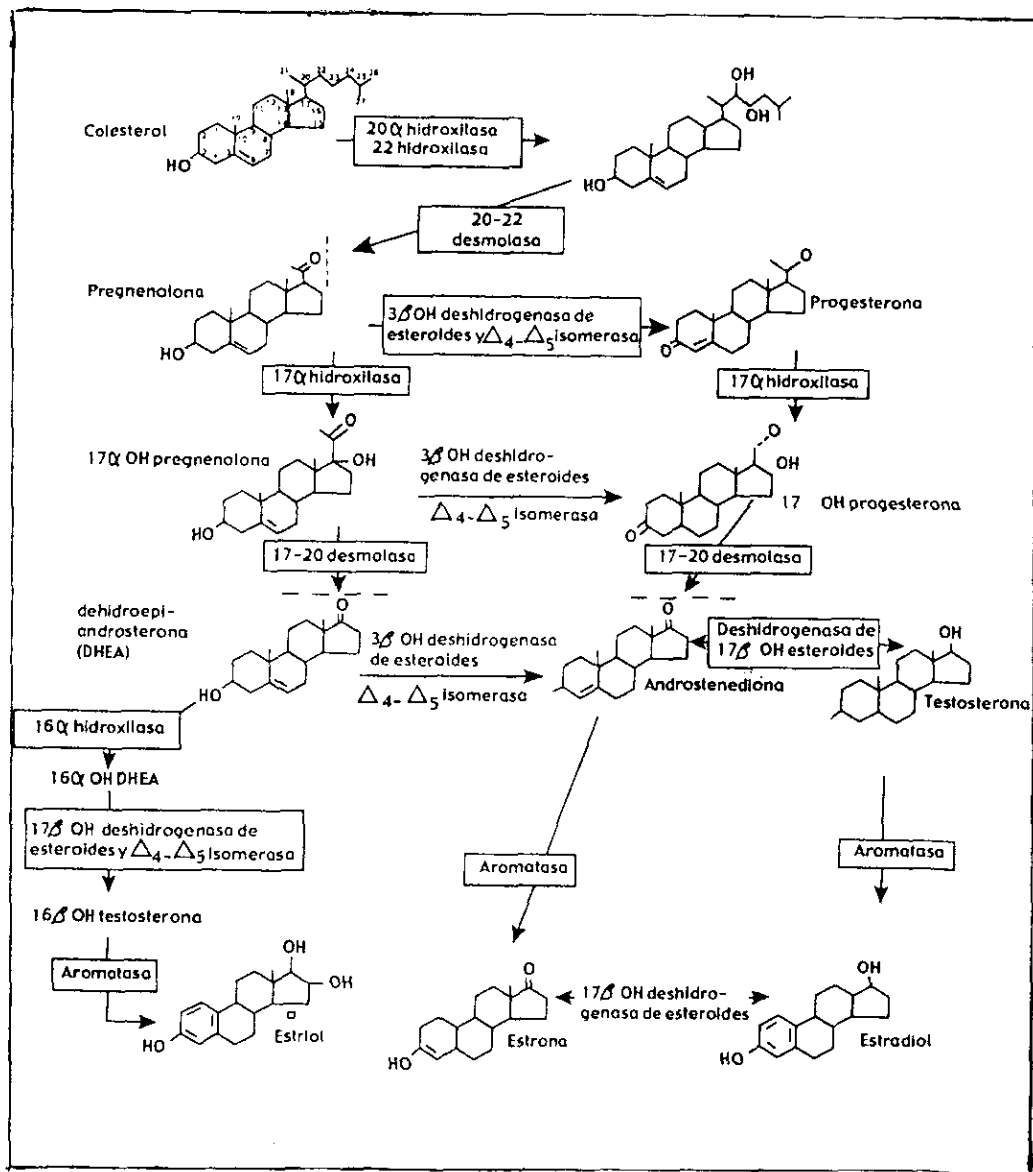


Figura 2.- Síntesis de esteroides sexuales. "Reproducción e inseminación artificial en animales" E. S. E. Hafez, 1987. Las flechas indican las vías probables y las enzimas que intervienen.

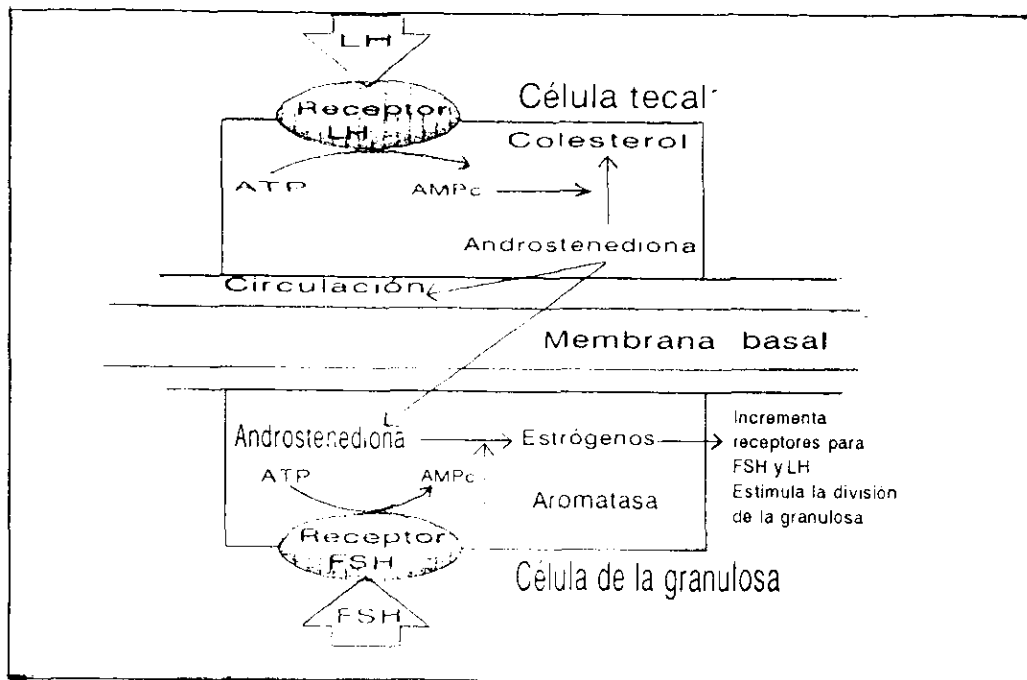


Figura 3.- Teoría de las dos células de Makris y Ryan. "Reproducción e Inseminación artificial en animales", E. S. E. Hafez. 1987.

Los estrógenos muestran funciones fisiológicas variadas: actúan en el sistema nervioso central para inducir el comportamiento de estro en la hembra, en el útero hace que aumente la masa del endometrio y del miometrio debido a una hiperplasia e hipertrofia celular, aumenta la actividad y frecuencia de las contracciones uterinas potencializando los efectos de la oxitocina y la prostaglandina $F_2\alpha$. El estradiol está relacionado con el desarrollo y función de los órganos sexuales y causa la aparición de los caracteres sexuales secundarios, el desarrollo de los caracteres sexuales de la hembra, el crecimiento y desarrollo de los conductos de la glándula mamaria. El E_2 ejerce efectos de retroalimentación negativa y positiva en el control de la liberación de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) a nivel hipofisiario (Berger, 1987). Los estrógenos también participan en la asimilación de calcio y osificación de los huesos, maduración del cartilago intersticial de los huesos largos e inhibición posterior, también originan un efecto anabólico de ganancia de peso y de crecimiento.

Los estrógenos se usan como abortivos en vacas y ovejas debido a que ejercen una acción luteolítica (regresión del cuerpo luteo), probablemente estimulada por la prostaglandina $F_2\alpha$. Sin embargo en la cerda, los estrógenos cumplen una acción luteotrópica (ayudan a mantener el cuerpo luteo) y por tanto, son usados en los sistemas de sincronización del estro con objeto de mantener a las cerdas en fase lutea hasta que se les retira el tratamiento con estrógenos y se continúa con inyección de prostaglandina $F_2\alpha$ que causa la reducción del cuerpo luteo (Hafez, 1987).

Progesterona - Es un esteroide de 21 átomos de Carbono Δ_4 que procede de la pregnenolona, con un peso molecular de 314.5, es el mas potente progestágeno natural y es secretado por células de la granulosa y por las células del cuerpo luteo, bajo la influencia de la LH y se produce a lo largo de todo el ciclo tanto en el ovario como en las glándulas suprarrenales y la placenta. (Brown, 1985) Los niveles plasmáticos son muy bajos en la fase folicular, alrededor de 0.5 ng/ml. y durante la fase lutea, es el cuerpo luteo el principal productor, incrementando sus concentraciones de 10 a 40 veces mas hasta valores de 28 ng/ml, esto se observa poco antes de la ovulación .

La progesterona (P_4) es transportada en la sangre por una globulina (CBG = Proteína transportadora de Cortisol) y su principal ruta metabólica supone su transformación a pregnanediol. Es metabolizada en el hígado en donde se transforma en numerosos metabolitos, su excreción urinaria ocurre una vez conjugada con el ácido glucurónico (Makris, 1975).

Su principal acción es en el tracto reproductor, donde ayuda a estimular la mucosa uterina para activar fisiológicamente al endometrio y lo prepara para recibir al óvulo que ha sido fecundado, evita la movilidad uterina que sería perjudicial para el curso del embarazo, suprime la secreción de la gonadotropinas pituitarias, actúa como anovulatorio evitando la maduración de nuevos folículos y la liberación de óvulos, en consecuencia, es antiestrogénica; estimula el desarrollo glandular mamario, es depresor del sistema nervioso central e induce al sueño.

Los niveles de progesterona en el plasma, son indicadores de la ovulación, por lo que son usados en la evaluación de pacientes con problemas de infertilidad debidos a defectos en la fase lutea, y deben ser cuantificados en la fase media lutea del ciclo, alrededor del día 21-22. El otro progestágeno producido en el ovario en grandes cantidades, es la 17α -hidroxiprogesterona. que procede del folículo en maduración y del cuerpo luteo y su secreción determina niveles plasmáticos paralelos a los de la progesterona, su metabolismo conduce a la formación de pregnanetriol y también se produce en las glándulas suprarrenales.

Andrógenos - Son los precursores de la biosíntesis de estrógenos, los dos mas abundantes son androstendiona y testosterona y su lugar de origen son las células tecaes y las glándulas suprarrenales. Los valores oscilan alrededor de los 150 ng/100ml de androstendiona para la mujer adulta, con mayor elevación en la fase lutea, mientras que la testosterona se secreta en cantidades menores. Hormonalmente se observa una máxima producción estrogénica por mas de dos días antes de la ovulación y esto genera una retroalimentación positiva para un aumento de LH que es la responsable de la maduración final del folículo (Brown, 1985)

Hormona Folículo Estimulante - La FSH es una glucoproteína producida por las células granulosa basófilas de la pituitaria anterior o adenohipófisis. Contiene una cadena alfa de 92 aminoácidos y una cadena beta de 118 aminoácidos. Estimula las células de la granulosa mediante receptores de membrana cuyo número por célula permanece constante durante el crecimiento del folículo, además induce la sensibilidad de las células de granulosa a la LH al aumentar el número de receptores para ésta. La actividad esteroideogénica (secreción de estrógenos y progestágenos) del folículo también depende de la acción sinérgica de la FSH y LH que actúan sobre células de la granulosa y teca.

En las mujeres después de la menopausia, la secreción hipofisaria de FSH aumenta notablemente debido a la carencia de secreción de esteroides; pasa la filtración renal y llega a la orina como gonadotropina post-menopausica humana (hMG).

Hormona Luteinizante. - La LH es secretada por las células beta de la pituitaria anterior bajo el control de las hormonas hipotalámicas liberadoras de gonadotropinas (GnRH). Es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 28,000 daltons y consta de dos cadenas, la alfa es similar a la cadena alfa de la FSH, con 92 aminoácidos y la cadena beta con 115 aminoácidos, diferente desde el punto de vista inmunológico y de bioactividad. La LH causa en la mujer la ovulación y la producción de esteroides (estrógenos y P_4) por las células del cuerpo luteo.

Los niveles circulantes de LH son controlados por una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo por las hormonas esteroideas. La FSH y LH son requeridas para una función sexual normal. En la especie humana en cada ciclo ovárico se estimula el crecimiento de aproximadamente 40 a 50 folículos primarios, presentando uno de ellos dominancia sobre los demás, si este folículo se vuelve atrésico, en una segunda oleada surge otro folículo dominante, de esta forma solo uno de ellos llega a la maduración y ovulación y los restantes sufren atresia, la cual es un proceso degenerativo de regresión (Adams 1993).

La maduración del ovocito es disparada por un aumento de gonadotropina preovulatoria (LH), pero la interacción hormonal que produce la maduración del complejo ovocito-corona-cumulus (COCC) aún requiere de mas investigaciones (Laufer, 1984).

Sinergismo de la producción hormonal y crecimiento folicular.

Las mujeres experimentan mensualmente ciclos sexuales que inician en la pubertad y que continúan a través de los años reproductivos. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es sintetizada por las células neurosecretoras del hipotálamo y se transporta por el sistema portal hipofisario al lóbulo anterior de hipófisis. Esta hormona liberadora para FSH y LH provoca la liberación cíclica de estas hormonas gonadotrópicas. La FSH y LH, producen cambios cíclicos sobre los ovarios provocando el desarrollo de los folículos, la ovulación y la formación del cuerpo amarillo.

Los folículos en crecimiento durante las etapas de maduración, ovulación y luteinización, dependen de patrones de secreción de la hipófisis, así como de concentraciones suficientes y relaciones correctas de FSH y LH en el suero sanguíneo.

La FSH promueve el crecimiento de 5 a 12 folículos primarios por ciclo de los que por lo regular solo uno llega a madurar. Los estadios finales de la maduración requieren de altas concentraciones de LH. Con la formación de folículos antrales, hay producción de estrógenos, el balance entre reductasa y aromataza producidas por las células tecales en estas etapas de formación del antro, pueden determinar una tendencia temprana del folículo a la atresia, y solo una mayor capacidad de aromatización por estas células puede impedirlo (Adams, 1993).

Después de la ovulación, las paredes del folículo y las tecas se colapsan y repliegan, y se convierten por acción de la LH en una estructura glandular llamada cuerpo luteo o cuerpo amarillo, que secreta principalmente progesterona y algo de estrógenos que actúan sobre el endometrio preparándolo para la implantación del blastocisto.

Si el óvulo es fecundado, el cuerpo amarillo crece e incrementa su producción hormonal apoyado por la presencia de la gonadotropina coriónica humana (hCG), y después de la semana 20, la placenta asume la producción de estrógenos y progesterona necesarias para la sustentación del embarazo. Si el óvulo no es fecundado, el cuerpo amarillo degenera de 10 a 12 días después de la ovulación transformándose en una cicatriz blanca llamada cuerpo albicans.

Las hormonas producidas por los folículos ováricos como el estradiol produce crecimiento del endometrio y el cuerpo amarillo, produce progesterona mantiene este crecimiento si hay embarazo, en el caso contrario la capa funcional de la pared uterina se descama y es expulsada durante 4 o 5 días por isquemia, lo que se conoce como menstruación. La producción hormonal en el ciclo ovárico controla el funcionamiento del ciclo menstrual.

En los ciclos naturales, cuando el ovocito es expulsado del ovario, rodeado de la zona pelúcida, acompañado de las células del cumulus ooforus y de la corona radiada (ovulación), es capturado por las fimbrias de las trompas de Falopio, en donde continúa su segunda división meiótica detenida en Metafase II, la cual solo se completa si el ovocito es fecundado. En parejas subfértiles y en mujeres que han sido tratadas con gonadotropinas para inducción de crecimiento folicular múltiple, se puede programar el momento en que la ovulación tendrá lugar. Las determinaciones séricas han sido de mucha utilidad en el diagnóstico y tratamiento de la mujer infértil.

Inducción de la ovulación

En la actualidad con el auge de la reproducción asistida, se han realizado una serie de procedimientos terapéuticos complejos, que requieren metodologías clínicas, quirúrgicas y de laboratorio como son la FIV y la GIFT, en los que el estudio de los óvulos humanos se ha incrementado al tratar de resolver el problema de parejas con infertilidad. Son varios los factores que conducen a estas parejas a recurrir a estas metodologías. Uno de los factores alterados en ellos es la ovulación, por lo que se han utilizado inductores que como ya se mencionó, estimulan el crecimiento y maduración de un mayor número de folículos, asegurando así un mayor número de ovocitos disponibles por ciclo (Rotsztein, 1992).

El citrato de clomifeno es la primera terapéutica de elección para la inducción de la ovulación para aquellas pacientes con amenorrea secundaria, que tienen una función hipofisaria normal y la posibilidad de una función hipotalámica normal. Su modo de administración es simple ya que está disponible como tableta, de tal manera que el control es fácil, poco costoso y casi nunca se presentan complicaciones. La administración de clomifeno durante las primeras fases del ciclo, en mujeres que ovulan regularmente, induce el incremento de gonadotropinas producidas por la pituitaria, las cuales también parecen aumentar el crecimiento preovulatorio del folículo.

Como desventaja debe mencionarse que es una sustancia sintética y no una hormona natural, que actúa a través de la inhibición competitiva de los receptores de estradiol. El clomifeno es un estrógeno débil que ocupa los receptores de E_2 con avidez (Seegar 1988).

Para estimular la actividad ovárica, se encontró que un bajo incremento en los niveles circulantes de FSH por arriba del umbral del nivel folicular (de 10 a 30%), ocasiona la foliculogénesis, además se ha encontrado que la FSH es la principal responsable de la iniciación de la producción de estradiol a través de la activación del sistema de enzimas aromatasas en las células de la granulosa y la selección y crecimiento folicular

La hormona luteinizante LH juega un papel de apoyo en la esteroidogénesis ovárica, estimulando las células de la teca ovárica para producir andrógenos, los precursores de la síntesis del estradiol. También es la principal responsable de la inducción de la maduración folicular final, la cual culmina con la liberación de un ovocito maduro del folículo. El uso de gonadotropina menopáusica humana propicia el desarrollo folicular múltiple y la gonadotropina coriónica humana simula el aumento súbito de LH que favorece la maduración y ovulación del folículo.

Los inductores de la ovulación usados con mayor frecuencia, son administrados en diferentes tipos de esquemas como son los siguientes (Diedrich K, 1992):

- 1.-Citrato de clomifeno /Gonadotropina menopausica humana /Gonadotropina coriónica humana. CC/hGM/hGC.
- 2.-Gonadotropina menopausica humana/Gonadotropina coriónica humana. hGM/hGC
- 3.-Hormona foliculo-estimulante /Gonadotropina coriónica humana. FSH/hGC
- 4.-Hormona liberadora de gonadotropinas/Gonadotropina menopausica humana/Gonadotropina coriónica humana. Agonista de GnRH/hGM/hGC.

En ciclos espontáneos el tamaño mínimo de los folículos antes del cual no se produce ovulación, es de 18 mm. El tamaño medio alcanzado suele estar entre los 21 y 25 mm pudiendo llegar en ocasiones a los 30 o 35 mm. Estos tamaños tan grandes, suelen aparecer mucho mas frecuentemente en mujeres mayores y es común que los ovocitos obtenidos sean de mala calidad, siendo esto uno de los motivos por los que en reproducción asistida la edad limite de la mujer es de hasta 35 años.

El tamaño de los folículos en ciclos inducidos con CC debe de ser de 18 mm. o bien deben de existir dos folículos de 17 mm. para que se pueda administrar la hMG, y 36 hrs después se produzca la ovulación. Empleando FSH el tamaño máximo que debe tolerarse antes de administrar la hCG no debe superar a los 15 mm.

Con el empleo de agonistas de la GnRH, la calidad y tamaño de los folículos dependen de la sustancia inductora empleada, sin embargo el margen de actuación es mayor, ya que es imposible la liberación endógena de LH (Bonilla 1992). En la actualidad se emplea la FSH recombinante con mejores resultados.

REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Algunas de las metodologías de reproducción asistida como la FIV y el GIFT, son procedimientos terapéuticos complejos que requieren metodologías clínicas, quirúrgicas y de laboratorio muy sofisticadas y complejas (cuya finalidad es la de obtener embriones), como la captura ovular mediante un acto quirúrgico en el que los ovocitos son recuperados por punción del folículo, ya sea durante una laparoscopia o mediante el uso de ultrasonido empleando para ello el transductor vaginal (Figuras 4 y 5).

Para la FIV se requieren los dos factores: por un lado, la recolección de ovocitos dentro de sus folículos, estimulados artificialmente por superovulación, y por otro lado, la recolección y capacitación de espermatozoides, mezclándolos en un medio favorable que facilite la fecundación (González, 1988). Una vez confirmada la fertilización y segmentación, se procede a realizar la transferencia embrionaria (TE).

La GIFT es el procedimiento mediante el cual se colocan ambos gametos (espermatozoides y ovocitos) en el sitio normal de la fecundación, es decir, en la región ampollar de la trompa de Falopio por laparoscopia.

Los folículos mayores de 20 mm. de diámetro, producto de un ciclo en el que se utilizan inductores de ovulación múltiple y puncionados durante el acto quirúrgico, se esperaría contar con ovocitos maduros, caracterizados por la presencia del primer cuerpo polar, la corona radiada dispersa, el cumulus oophorus con las células de la granulosa dispersas en un material con alto grado de mucificación. Sin embargo, no todos los ovocitos capturados presentan estas características, muchos de ellos se encuentran en la etapa de vesícula germinal, con la corona radiada compacta y el cumulus sin mucificar, correspondiendo a ovocitos inmaduros o en otros casos el folículo puncionado corresponde a un ovocito atrésico o a uno post-maduro (Testard 1983).

En ocasiones un segundo problema se presenta en el que estas características morfológicas se encuentran desfasadas, resultando aun más difícil su adecuada clasificación y subsecuente manejo, ya que durante la fertilización "in vitro" los ovocitos inmaduros se someten a incubación en medios especialmente preparados para ayudarlos a madurar y después de 24 o 36 horas son inseminados

Los ovocitos maduros y postmaduros se inseminan después de 4-6 horas de la captura y se dejan en incubación por 36 a 48 horas para tener de 2 a 4 blastómeras.

Debido a una clasificación errónea muchos ovocitos son procesados de forma incorrecta; un ovocito inseminado antes de tiempo, presenta menos probabilidades de madurar, fertilizar y segmentar (Laufer 1984; Bomsel 1987; Hammitt 1993). Por otro lado se reporta que los ovocitos inmaduros sometidos a maduración pueden alcanzar un desarrollo adecuado obteniéndose con éstos un número de embarazos que llega al 30% (Edwards, 1984).

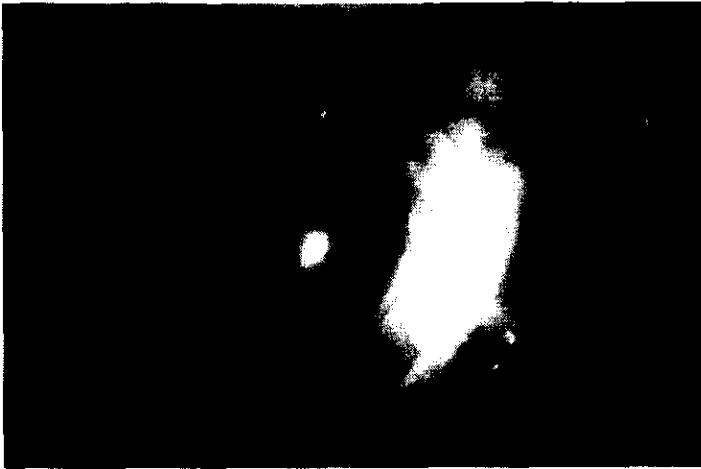


Figura 4.- Aspecto de un folículo maduro en el que se ve una zona clara menos vascularizada llamada "ostium", en donde la pared del folículo se adelgaza preparándose para la ovulación. La aguja para la succión del Lf aparece sobre el folículo.



Figura 5.- Aspecto de un folículo durante la succión del Líquido folicular. La punción se realiza siempre cerca de la zona de unión con el estroma ovárico para evitar el derrame del Lf.

Aspectos de la punción folicular durante la captura de ovocitos por Laparoscopia

La calidad del ovocito y su grado de maduración son directamente dependientes del microambiente folicular el cual sufre cambios importantes durante su crecimiento, enriqueciéndose con proteínas, aminoácidos, enzimas, carbohidratos, glucoproteínas, hormonas, inmunoglobulinas y sales (Ver el cuadro 1), así que resulta importante analizar las características bioquímicas ya conocidas del mismo, y correlacionarlas con la madurez del ovocito en ciclos inducidos.

El Lf tiene varias funciones entre las que se incluyen:

- a) regulación de las funciones de las células de la granulosa
- b) maduración del ovocito, ovulación y transporte del óvulo hacia el oviducto
- c) preparación del folículo para la formación posterior del cuerpo luteo
- d) estimulación e inhibición de algunos componentes que regulan el ciclo folicular (Ver cuadro 2)

El volumen del Lf expulsado durante la ovulación es importante, ya que se ha encontrado una correlación directa entre el tamaño del folículo, los mililitros del Lf y el estado de madurez del ovocito; sin embargo durante la captura por laparoscopia o ultrasonido, al puncionar el folículo, se pierde parte del líquido, o se contamina con sangre, por lo que en la práctica, no puede ser tomado como un parámetro certero.

El Lf es un medio sumamente complejo e importante que junto con las secreciones del oviducto, contribuyen a los procesos de hiperactivación y reacción acrosomal de la membrana de los espermatozoides, que son los pasos previos a la fecundación del ovocito. Estas reacciones son el producto del efecto de la P_4 presente en estos líquidos (Revelli, 1995; Sabeur, 1996).

Por otro lado se sabe que el contenido en esteroides del Lf aumenta el volumen folicular, y que el tratamiento con gonadotropinas produce un incremento en la actividad de la fosfatasa en el complejo de Golgi de células esteroidogénicas, lo cual sugiere que el sistema lisosomal juega un papel importante en la esteroidogénesis ovárica (Elfont 1977).

Por lo que respecta a la enzima fosfatasa ácida (Fác), es un constituyente del Lf de diferentes especies, por ejemplo, en los bovinos la mayor concentración de Fác, se encontró en el líquido de los folículos antrales pequeños. Sin embargo Henderson (1990), encontró que la actividad total de Fác por folículo aumenta con el tamaño del folículo y su concentración al contrario de otras especies no se asoció con atresia. La Fác en el útero de bovinos ha demostrado que inactiva los receptores a estrógenos por desfosforilación. La Fác del Lf también puede funcionar como un inactivador de fosfoproteínas e inactivar a la proteína quinasa dependiente del AMP-c (Adenosin monofosfato cíclico). Altas concentraciones de Fác en el Lf pueden limitar la capacidad del folículo para responder a la estimulación de las gonadotropinas.

Otros componentes del Lf son transudados directos del plasma sanguíneo y entre éstos se encuentran los carotenos y las bilirrubinas, que le dan la coloración amarilla, la cual presenta variaciones tanto en la intensidad como en la concentración en los diferentes folículos, aun en los del mismo ovario. Se sabe que los carotenos (α , β , γ , δ), licopenos, xantofilas, zeaxantinas y criptoxantinas, son pigmentos amarillos de la familia de los terpenoides. En el humano, éstas sustancias no se sintetizan, son productos derivados de la dieta, principalmente de frutas y vegetales.

Cuadro 1

COMPONENTES Y METABOLITOS DEL LIQUIDO FOLICULAR

Componentes bioquímicos	Compuestos
Proteínas	Albúminas, globulinas, IgA, IgM, fibrinógeno, lipoproteínas, péptidos
Aminoácidos	Asp, Thr, Glu, Gln, Gli, Ala
Enzimas	Intracelulares y extracelulares
Carbohidratos	Glucosa, fructosa, fucosa, galactosa, manosa.
Glucoproteínas	Glucosamina, galactosamina, ácido hialurónico, glicosaminoglicanos sulfatados, heparina y sus sulfatos, plasminógeno
Gonadotropinas	FSH, LH y sus subunidades; prolactina
Esteroides	Colesterol, andrógenos, progestágenos, estrógenos
Prostaglandinas	PGE, PGF ₂ , α
Elementos y sales	Sodio, potasio, magnesio, zinc, cobre, calcio, azufre, cloro, fosfato inorgánico, fósforo
Inmunoglobulinas	Predomina la IgG. Menor cantidad IgA. La concentración de IgG en el líquido, aumenta conforme los folículos crecen, hasta alcanzar las dimensiones preovulatorias

Cuadro tomado de Reproducción e inseminación artificial en animales, editado por E.S.E. Hafez 5ª Edición 1989

Cuadro 2

COMPONENTES FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL LÍQUIDO FOLICULAR

Sustancia	Respuesta fisiológica
Inhibidores	
Inhibidor de maduración del ovocito (OMI)	Inhibe la terminación de la meiosis del ovocito
Inhibidor de la luteinización	Evita o inhibe la luteinización de las células de la granulosa
Inhibidor que se une a receptores de FSH	Disminuye la unión de FSH a células de la granulosa
Inhibina (Sustancia supresora de FSH)	Disminuye la secreción de FSH
Estimulantes	
Estimulante de la luteinización	Estimula la luteinización de la granulosa
Otros factores	Promueve la capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide.

Cuadro tomado de Reproducción e Inseminación en animales Editado por E.S.E. Hafez 5a. Edición 1989

Se sabe que éstos compuestos son precursores de la vitamina A, la cual es importante para la integridad epitelial, la síntesis de mucopolisacáridos, además de poseer propiedades anti-oxidantes.

De todos los terpenoides, el β -caroteno es el más importante porque es 100% pro-vitamina A, por lo cual juega un papel importante en la fisiología del ovario (Bayer, 1992).

Las bilirrubinas son el producto metabólico de los compuestos que contienen grupo heme o grupo hemato, como la hemoglobina, la mioglobina, los citocromos y las peroxidasas. La mayor parte de la bilirrubina es derivada del metabolismo de la hemoglobina de los eritrocitos muertos. La bilirrubina es insoluble e inmediatamente después de ser sintetizada, se une a la albúmina. Esta fracción es llamada bilirrubina no conjugada y es transportada al hígado en donde los hepatocitos conjugan la bilirrubina a ácido glucurónico la cual promueve su excreción a la bilis. Bayer (1992), confirmó la presencia de bilirrubina conjugada y sin conjugar en las fracciones de todas las muestras de Lf de folículos preovulatorios analizados y concluye que hay una relación entre el pico de absorbancia de la bilirrubina y la madurez del ovocito. En trabajo previo, se encontró la presencia del mismo pico de absorbancia a 455 nm. para ovocitos maduros (Téllez J.M. 1994).

III HIPÓTESIS

El microambiente del ovocito cambia conforme el folículo crece, la composición y cuantificación de los diferentes componentes presentes en el líquido folicular, pueden constituir una pauta para conocer el estado de evolución por el que esta célula está pasando.

OBJETIVO GENERAL

Encontrar marcadores bioquímicos del estado real de la madurez del ovocito, presentes en el microambiente formado por el líquido folicular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Describir la morfología microscópica del ovocito en el momento de su captura y el grado de expansión del complejo ovocito-corona radiada-cumulus(COCC).
- 2.- Evaluar las concentraciones de diferentes compuestos en el Lf, como son: fosfatasa ácida, estradiol, hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante y proteínas.
- 3.- Caracterizar el barrido espectrofotométrico del líquido folicular en el área de luz visible entre 350 a 600 nm.
- 4.- Relacionar los estos parámetros anteriores para localizar el marcador mas adecuado de madurez.

JUSTIFICACIÓN

Lograr una clasificación mas clara de los ovocitos en el momento en que son capturados, durante los procedimientos de reproducción asistida, con la finalidad de procesarlos y obtener fertilizaciones y segmentaciones exitosas, ya que existen muchos intentos fallidos en la fertilización cuando ésta se realiza utilizando únicamente la observación morfológica para la evaluación del ovocito.

IV MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio incluyó 34 pacientes de 32.9 ± 3.8 años de edad (con un rango entre 27 y 39 años), en las que se presentó daño tubario severo y/o factor masculino alterado. El desarrollo folicular fue inducido con 150 U.I. (2 ampolletas) de hMG (Pergonal, Serono), administradas del día 3 al 9 del ciclo (tercer día del inicio de la menstruación), y se incrementó solo en caso necesario de acuerdo a la respuesta individual, la cual fue monitoreada por ultrasonografía diaria.

Cuando el tamaño del folículo fue al menos de 18 mm., se administró 10,000 U.I. de hCG intramuscular, para simular la ola de LH que de forma natural se presenta 36 horas antes de la ovulación. La laparoscopia fue realizada 36 horas después y los folículos grandes con diámetros de 22 a 26 mm fueron aspirados. Los Lf correspondieron a dos grupos: el primero a 16 pacientes programadas para FIVTE y el segundo a 18 pacientes programadas para GIFT.

Clasificación de los ovocitos al microscopio de luz:

Los ovocitos fueron separados del líquido folicular usando un microscopio estereoscópico y clasificados con la ayuda de un microscopio invertido Carl Zeiss a 500X aumentos, tomando en cuenta las características morfológicas del cumulus, la corona radiada, el ovoplasma y células de la granulosa de acuerdo a lo descrito en trabajo previo del grupo (González 1988), con los siguientes grados de desarrollo.

- 1.- **Inmaduros:** (Ovocito en Profase I) Cumulus denso, poco expandido, compacto; corona compacta y muy adherida, células de la granulosa agregadas, el citoplasma del ovocito es oscuro y muestra su vesícula germinal y organelos agrupados (Figura 6).
- 2.- **Intermedios:** (Ovocito en Metafase I) Cumulus expandido y corona radiata ligeramente compacta, la granulosa dispersa alrededor del ovocito (Figura 7).
- 3.- **Maduro:** (Ovocito en Metafase II) Cumulus muy expandido y corona radiada dispersa, distribuida igualmente alrededor del ovocito. La granulosa está pobremente agregada, el citoplasma con una zona clara y cuerpo polar visible (Figura 8).
- 4.- **Post maduros:** Cumulus expandido con agrupación de células, corona radiada irregular, zona pelúcida visible, citoplasma regular, oscuro (Figura 9).
- 5.- **Atrésico:** Cumulus ausente o en pequeños grumos, igual que la corona si está presente es irregular, el ovoplasma es oscuro y retraído (Figura 10).

Barrido espectrofotométrico

El líquido folicular fue centrifugado a 5000 rpm, durante 10 min. Las células de la granulosa fueron separadas y el Lf congelado a -20°C hasta realizar los análisis de todos ellos. El total de folículos aspirados fue de 141 de los cuales solo 103 tuvieron ovocito. Los Lf hemáticos fueron excluidos de este estudio, ya que la presencia de sangre en él podía alterar los resultados bioquímicos. El análisis de todos los parámetros bioquímicos, hormonales y espectrofotométricos se realizó solo en 67 muestras. El patrón de absorbancia se midió en el Lf realizando un barrido en el espectro de la luz visible de 350 a 600 nm. con un espectrofotómetro Philips PU8720.

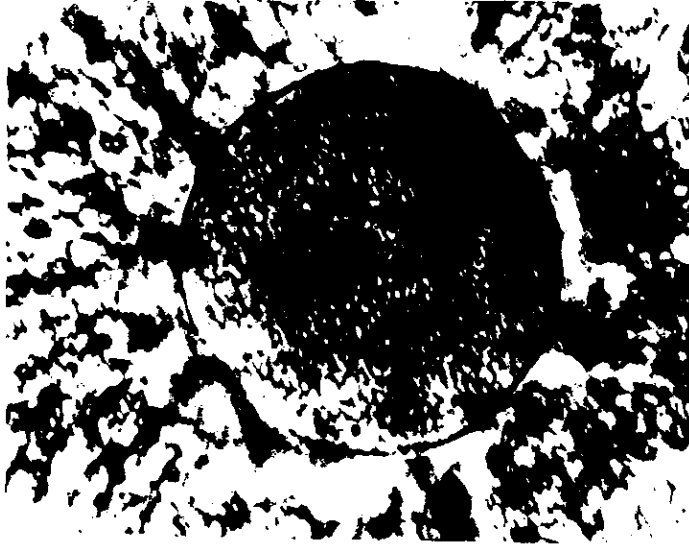


Figura 6.- Ovocitos Inmaduros(en profase). Ovocitos grandes de forma irregular con un ovoplasma granular y vesícula germinal con nucleolo, células adyacentes del cumulus en capas de aspecto compacto. Observado en microscopio de contraste de fases con filtro verde y un aumento de 500 X.

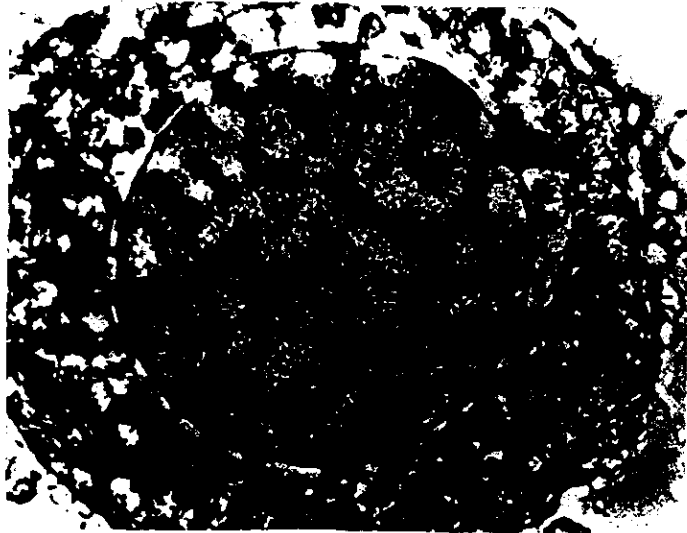


Figura 7.- Ovocitos Intermedios (en metafase I). Ovocito redondeado y uniforme, con ovoplasma granular donde la vesícula germinal ha desaparecido. El cumulus se encuentra expandido y la corona radiada compacta. Observado en microscopio de contraste de fases con filtro verde y un aumento de 500 X

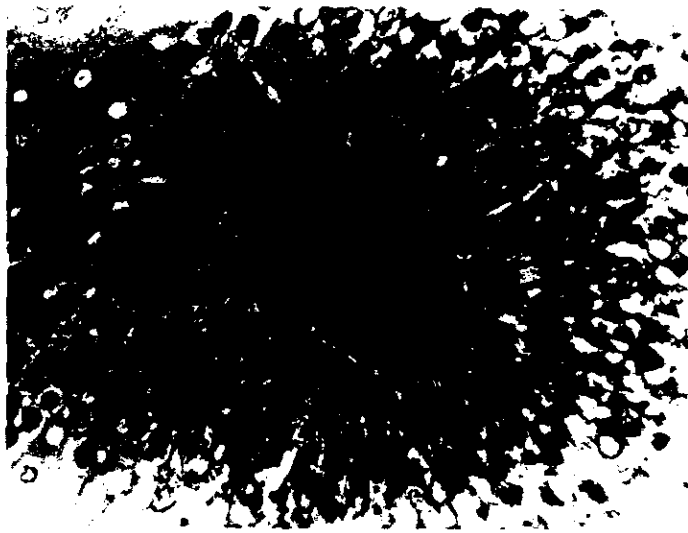


Figura 8.- Ovocito Maduro(en metafase II). Ovocito de forma redonda y uniforme, con citoplasma claro, granulado y homogéneo. El primer corpúsculo polar visible, el cumulus expandido y la corona radiada dispersa con aspecto radiado. Observado en microscopio de contraste de fases con filtro verde y un aumento de 500 X.



Figura 9.- Ovocito post maduro con citoplasma oscuro y células asociadas al cumulus aglutinadas, sometido a un lavado con Tripsina y hialuronidasa. Observado en microscopio de contraste de fases con filtro verde y un aumento de 500 X

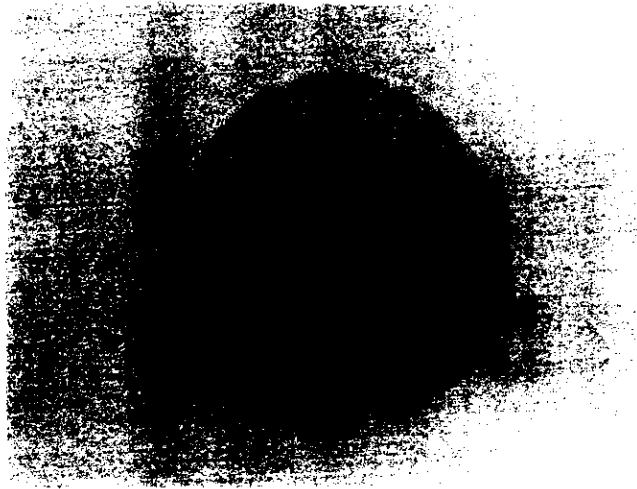


Figura 10.- Ovocito atrésico, puede mostrar un núcleo en cualquier etapa de maduración y un citoplasma muy oscuro, retraído e irregular. Están casi desprovistos de células de la corona y cumulus y se asocian con células foliculares de apariencia degenerativa. Observado en microscopio de contraste de fases con filtro verde y un aumento de 500 X.

Radioinmunoensayo de hormonas

Las determinaciones de LH (Catálogo número: KLHD1) y FSH (Catálogo número: KFSD1) fueron realizadas usando una técnica de radioinmunoensayo con ^{125}I de doble anticuerpo (Diagnostic Products Corporation).

El método está basado en un anticuerpo específico anti-FSH y anti-LH y un trazador de ^{125}I . La muestra y el anticuerpo son pre-incubados. La FSH y la LH radiomarcadas compiten con la LH y FSH en la muestra para los sitios del anticuerpo, durante un segundo paso de incubación. La fracción unida al anticuerpo es precipitada y contada y las concentraciones de la muestra leídas y calculadas de una curva de calibración (Ver apéndice 1). El procedimiento base requiere un tiempo total de incubación de 1.5 hora y se expresan en desintegraciones por minuto y la concentración de hormonas en unidades internacionales por mililitro, mIU/ml.

Los niveles de estradiol (E_2), fueron medidos por radioinmunoensayo de acuerdo al método SESTR-CTRIA (Cis Bio International, ORIS Group. France.). El principio del análisis se basa en la competencia entre el estradiol marcado con ^{125}I y el estradiol contenido en los estándares o las muestras que van a ser analizadas por un número fijo y limitado de sitios de unión al anticuerpo.

Después de la incubación, la cantidad de estradiol sin marcar unido al anticuerpo, está inversamente relacionada a la cantidad de estradiol sin marcar presente en la muestra. El método adoptado para la separación de los tubos para la curva estándar está basado en el uso de tubos cubiertos. (Ver apéndice 2)

Determinación de proteínas

Las proteínas fueron medidas de acuerdo al método modificado de Lowry (Lowry 1951). Se utilizó albúmina de suero bovino fracción V de Sigma (Catálogo A-3912) como estándar para realizar la curva patrón y los resultados de las muestras calculados sobre la base de ésta y expresados en miligramos de proteína (Ver apéndice 3).

Determinación de fosfatasa ácida

La determinación de fosfatasa ácida (F.ác) fue realizada de acuerdo al procedimiento 104 de Sigma Diagnostics, usando p-nitrofenol fosfato como sustrato, el cual pudo ser cuantificado colorimétricamente ya que al hidrolizarse por la enzima produce p-nitrofenol y fosfato inorgánico, que cuando se alcaliniza se transforma en un complejo amarillo el cual presenta su máxima absorbancia entre 400-420nm. La longitud de onda para las lecturas fue de 410 nm (Ver apéndice 4).

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue el Ham F-10 (Gibco, Grand Biological Island N.Y. apéndice 5), enriquecido con suero de cordón umbilical humano al 10%, piruvato de sodio 2 mM. y bicarbonato de sodio para ajustar el pH. de 7.2-7.4. La osmolaridad se ajustó entre 280-290 mOsm/kg.

La sangre de cordón umbilical fue colectado durante el parto de mujeres sanas, sin tratamiento medicamentoso y sin anestesia. La sangre fue centrifugada a 5000 r.p.m. durante 15 min, el suero claro separado del paquete fue incubado a 56°C. para inactivarlo durante 60 min. y después se esterilizó con filtro millipore de 0.22 μ m de diámetro (Millipore Corp.)

Ovocitos

Treinta y cinco ovocitos, fueron transferidos durante el mismo acto quirúrgico en los procedimientos de GIFT. Este método se realizó colocando en un catéter especial en forma secuencial 50 μ l (microlitros) de medio de cultivo con 100,000 ó 150,000 espermatozoides, una burbuja de aire, los ovocitos en 50 μ l de medio, una burbuja de aire, 50 μ l de medio con igual cantidad de espermatozoides y una burbuja de aire. Este catéter lo coloca el cirujano en el primer tercio de la trompa de falopio y ahí lo deposita, levantando la trompa para evitar que el líquido con los gametos salga a la cavidad abdominal.

Treinta y dos ovocitos fueron cultivados a diferentes tiempos para FIV; los ovocitos maduros se inseminaron después de 6 horas de cultivo, los ovocitos clasificados como inmaduros o intermedios, se mantuvieron de 18 a 24 horas en cultivo antes de ser inseminados. La inseminación se realizó con 100,000 ó 150,000 espermatozoides previamente capacitados y su evolución fue observada de forma continua.

La capacitación se realizó separando los espermatozoides del líquido seminal agregándoles medio de cultivo para lavarlos y centrifugarlos por dos ocasiones, se agregó al botón 1ml. de medio de cultivo F10 con 7.5 % de suero de cordón umbilical, 0.5 ml. de piruvato de sodio 2mM, 0.5 ml de lactato de sodio por cada 100 ml. de medio.

La incubación se realizó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 durante una hora. Después de este tiempo, se separó la parte superior en donde sobrenadaron los espermatozoides con mejor movilidad, se contaron y se ajustó la concentración para cada uno de los procedimientos.

Los resultados de las determinaciones bioquímicas del Lf. se presentan como promedio y desviación estándar correspondiente y fueron estadísticamente analizados por la prueba no paramétrica de Mann-Whitney que permite la comparación de poblaciones desiguales y el análisis de correlación de Pearson para conocer en qué proporción una variable afecta a otra.

V RESULTADOS y TABLAS

Clasificación morfológica

La clasificación microscópica de los ovocitos de acuerdo a su estructura morfológica mostró que 24 ovocitos fueron inmaduros (35.8%), 30 fueron maduros (44.8 %) y 13 intermedios (19.4%) tabla 1. De este total de 67, 35 fueron transferidos para el procedimiento de GIFT y 32 para FIV.

Barrido espectrofotométrico

Los resultados de la lectura del Lf en el espectrofotómetro mostró un grupo de 33 Lf con un pico de máxima absorbancia a 413.53 ± 2.50 nm, para ovocitos clasificados como inmaduros. Un segundo grupo de 30 muestras presentó un pico de máxima absorbancia a 456.8 ± 2.38 nm., que corresponde a ovocitos maduros; la lectura del tercer grupo con cuatro muestras mostró dos picos de máxima absorbancia; uno a 415.7 ± 1.23 nm. y el otro a 455.17 ± 7.11 nm correspondiente a ovocitos intermedios (tabla 1).

En la tabla 2 se muestra el destino de los ovocitos de acuerdo al procedimiento de reproducción asistida que cada uno de ellos recibió, unido al pico de absorbancia localizado en el Lf respectivo, de los que se desprende que de las 33 muestras del Lf con pico a 413.53 nm; 19 de los ovocitos de éstas muestras fueron transferidos a la trompa de falopio en el mismo acto quirúrgico (GIFT), mientras que 14 ovocitos de éste mismo grupo fueron cultivados e inseminados "in vitro"(FIV), encontrándose que de éstos 4 evolucionaron y dieron origen a 4 blastómeras, otros 4 presentaron 2 pronúcleos y los 6 restantes, se quedaron sin cambio alguno (Figuras 11 y 12).

De las 30 muestras de Lf. con pico de máxima absorbancia a 456.8 nm se encontró que de los ovocitos, 14 de ellos fueron usados para GIFT, mientras que los 16 restantes al ser cultivados "in vitro", evolucionaron de la siguiente manera: 10 de ellos (62.5%) segmentaron hasta el estadio de 4 blastómeras, 4 de ellos presentaron 2 pronúcleos, y los 2 restantes no presentaron cambios.

Las 4 muestras restantes, presentaron dos picos de máxima absorbancia, uno a 415.7 nm y el otro a 455.17 nm y los ovocitos correspondientes, dos de ellos fueron transferidos a GIFT y otros dos fueron incubados para FIV sin presentar ningún cambio durante su incubación.

En las gráficas 2 de barrido espectrofotométrico a), b) y c) se muestran los resultados obtenidos con el espectrofotómetro Philips PU 8720, de los diferentes Lf. En las tres curvas se observa el pico de máxima absorbancia de dos muestras de cada uno de los grupos y se muestran las diferentes concentraciones de pigmentos de cada uno de ellos.

Volumen del líquido folicular.

El volumen de Lf obtenido en cada punción, no presentó diferencias entre los tres grupos, esto pudo ser debido a que en algunos casos, parte de estos líquidos se perdieron durante el acto quirúrgico, por lo que estos datos no fueron evaluados en los análisis estadísticos.

TABLA 1

CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS

GRUPO	Observación microscópica		Barrido espectrofotométrico		Absorbancia
	# de ovocitos	porcentaje	# de ovocitos	porcentaje	
Inmaduros	24	35.8	33	49.4	413.53 ± 2.50
Maduros	30	44.8	30	44.8	456.80 ± 2.38
Intermedios	13	19.4	4	6	415.70 ± 1.23
					455.17 ± 7.11
Total	67	100%	67	100%	

Barrido espectrofotométrico realizado entre 300 a 600 nm.

TABLA 2

EVOLUCIÓN DE LOS OVOCITOS

Barrido Espectrofotométrico de 300 a 600 nm	Número de Ovocitos usados		Evolución de ovocitos en la FIV		
	muestras	para GIFT	4B*	2P**	SC***
413.53 ± 2.50	33	19	4(28.6%)	4(28.6%)	6(42.%)
456.80 ± 2.38	30	14	10(62.5%)	4(25%)	2(12.5%)
415.7 ± 1.23 455.17 ± 7.11	4	2	0	0	2

* Cuatro blastómeras

** Dos pronúcleos

*** Sin cambios durante la incubación



Figura 11.- Ovocito con dos pronúcleos. Evolución de los ovocitos inseminados y cultivados "in vitro". Observación al microscopio de contraste de fases con filtro verde y aumento de 500X

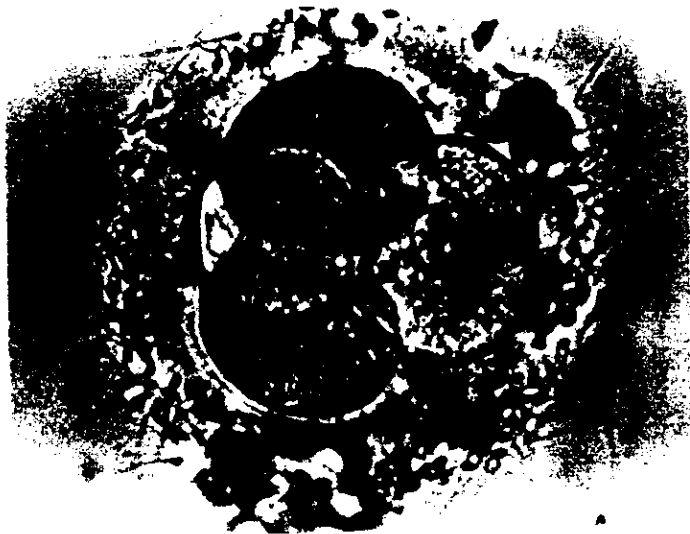
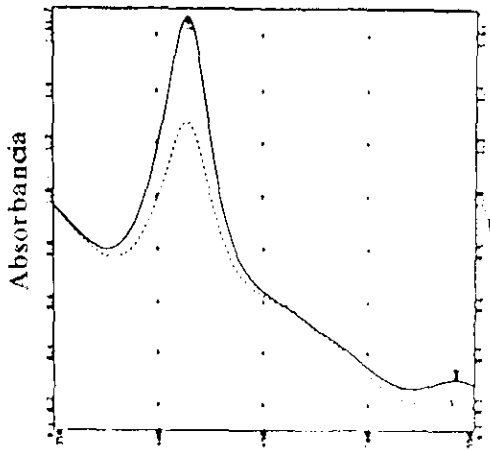
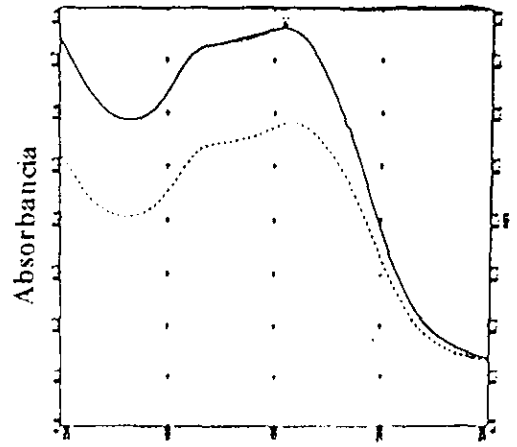


Figura 12.- Segmentación con cuatro blastómeras. Evolución de los ovocitos inseminados y cultivados "in vitro". Observación al microscopio de contraste de fases con filtro verde y aumento 500X



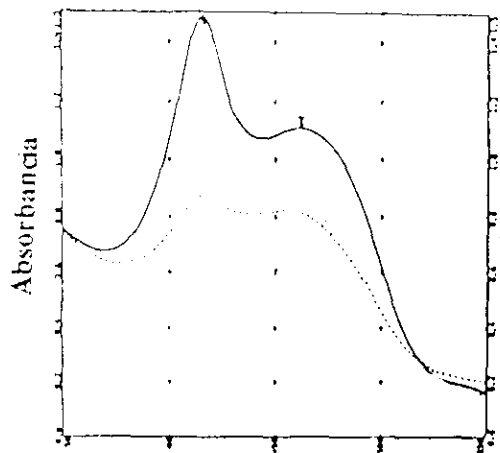
Nanómetros

Gráfica 2 a



Nonómetros

Gráfica 2 b



Nanómetros

Gráfica 2 c

Gráfica 2.- Barrido espectrofotométrico de líquidos foliculares.

- a) Pico de máxima absorbancia a 413.53 ± 2.14 correspondiente a ovocitos inmaduros.
- b) Pico de máxima absorbancia a 457.32 ± 2.27 correspondiente a ovocitos maduros
- c) Picos de máxima absorbancia a 416.37 ± 1.58 y a 458.2 ± 2.42 para ovocitos intermedios

Bioquímica

Los resultados de la determinación de proteínas, fosfatasa ácida y radioinmunoensayo de hormonas fueron agrupados de acuerdo a los grupos de máxima absorbancia ya descritos y se muestran en la Tabla 3.

Análisis de proteínas

La concentración de proteínas en el Lf de ovocitos inmaduros mostró fluctuaciones que oscilaron entre 34.9 a 113.26 mg/ml los que al ser promediados nos dieron 82.79 ± 16.64 . En el grupo de ovocitos maduros se encontró una variación en la concentración con valores de 46.8 a 113.3 mg/ml con un promedio de 86.13 ± 15.97 mg/ml. El tercer grupo de Lf procedente de ovocitos intermedios presentó variaciones entre 76.4 a 90.6 con promedio de 83.9 ± 4.93 mg/ml.

Las variaciones entre los diferentes grupos fueron analizadas por el método de Mann-Whitney y los resultados mostraron que no existían variaciones significativas entre ellos, lo que significa que las proteínas analizadas corresponden a un mismo grupo de población. Con los datos de concentración de proteínas se realizó un análisis de correlación de Pearson contra los diferentes parámetros estudiados. El coeficiente de correlación mostró valores significativos en el grupo de ovocitos intermedios cuando se comparó con los diversos parámetros como se muestra en la tabla 4, en donde se observa una correlación con los niveles de LH, FSH, E_2 , y con la absorbancia I y II. El valor de r obtenido para estas variables fue significativo a nivel de 0.025. En el grupo de ovocitos maduros e inmaduros la correlación fue muy pequeña no siendo significativa en ninguno de los parámetros estudiados.

Fosfatasa ácida.

Los niveles de F.ác. fueron similares en los tres grupos, el análisis no paramétrico mostró que no había diferencias significativas en los tres grupos, aún cuando el nivel mas bajo de enzimas se encuentra en el Lf de ovocitos intermedios como se puede ver en la Tabla 3.

El coeficiente de correlación de Pearson fue significativo únicamente al comparar la absorbancia del pico II de ovocitos intermedios, con los niveles de esta enzima, mostrando una buena correlación de $r = -0.960$ con un nivel de significancia de 0.025.

TABLA 3

ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL LÍQUIDO FOLICULAR

ANÁLISIS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Número de muestras	33	30	4
Volumen en ml	4.13 ± 2.60	3.06 ± 2.59	6.0 ± 5.34
Proteínas mg/ml	82.79 ± 16.64	86.13 ± 15.97	83.90 ± 4.93
Estradiol ng/ml	923.00 ± 505.00	1282.00 ± 682.00	1741.00 ± 270.00
LH mUI/ml	41.21 ± 20.13	41.06 ± 17.71	48.95 ± 20.46
FSH mUI/ml	4.54 ± 2.79	4.468 ± 3.725	6.32 ± 4.03
Fosfatasa ácida UI/ml	3.27 ± 3.16	7.50 ± 6.04	25.38 ± 8.17

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL LÍQUIDO FOLICULAR

BARRIDO	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
ESPECTROFOTOMÉTRICO			
Pico I	413.53 ± 2.50		415.70 ± 1.23
Absorbancia pico I	0.763 ± 0.401		1.276 ± 0.377
Pico II		456.8 ± 2.38	455.17 ± 7.11
Absorbancia pico II		0.586 ± 0.223	0.792 ± 0.300

Los datos representan el promedio ± desviación estándar

Radioinmunoensayo

LH.

Los resultados encontrados al evaluar la LH en el Lf. de ovocitos inmaduros mostraron variaciones que oscilaron entre 6.6 a 86 mUI/ml con un promedio de 41.21 ± 20.13. En el Lf de ovocitos maduros, el valor mas bajo de esta hormona fue de 7.40 y el mas alto de 85.40 mUI/ml con un promedio de 41.06 ± 17.71. Para los ovocitos intermedios los valores encontrados fueron de 13.0 a 84.0 mUI/ml con un promedio de 48.95 ± 20.46. La correlación de esta hormona con los diferentes parámetros fue muy pobre, mostrando correlación solo con algunos de ellos. En ovocitos inmaduros se encontró correlación con los niveles de FSH significativa con una $r = 0.414$. En el grupo de ovocitos maduros no existe ninguna correlación significativa, y en el grupo de ovocitos intermedios existe buena correlación con los niveles de FSH $r = 0.924$, con proteínas $r = 0.703$ y con los niveles de absorbancia del pico II $r = 0.894$ todos ellos los significativos al nivel de 0.025.

FSH

Los valores de FSH en el Lf de los diferentes grupos de ovocitos mostraron los siguientes resultados: Para el grupo de ovocitos inmaduros se encontraron valores entre 0.200 a 9.90 mUI/ml con un promedio de 4.539 ± 2.791 . Para los ovocitos maduros los valores oscilaron entre 0.080 y 12.60 mUI/ml con un promedio de 4.468 ± 3.725 ; finalmente en el grupo de ovocitos intermedios los valores reportados son de 0.20 a 12.6 mUI/ml con un promedio 6.32 ± 4.03 .

El coeficiente de correlación para la FSH en los ovocitos inmaduros solo fue significativo con los valores de LH con $r = 0.414$. En los ovocitos maduros solo se presentó correlación con los niveles de máxima absorbancia con $r = -0.586$. En el grupo de ovocitos intermedios solo se encontró correlación con la LH $r = 0.924$, con los niveles de proteína $r = 0.763$ y con los niveles de absorbancia del pico II $r = 0.840$.

ESTRADIOL.

El análisis de los niveles de E_2 en el Lf de ovocitos inmaduros mostró variaciones que fluctuaron entre 130 hasta 2097 ng/ml con promedio de 923 ± 505 ng/ml. En el grupo de ovocitos maduros, los valores oscilaron entre 253 a 2579 con promedio de 1282 ± 682 ng/ml y en el grupo de ovocitos intermedios los valores fueron de 1458 a 2228 con promedio y desviación estándar de 1741 ± 270 ng/ml.

El análisis de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos, sin embargo hay una tendencia a aumentar el nivel de E_2 en los Lf de ovocitos intermedios y maduros. Al realizar el análisis de correlación de los diferentes grupos solo se encontró correlación significativa en el grupo de ovocitos intermedios al correlacionar los niveles de esta hormona con los niveles proteína con una $r = 0.771$, con los niveles de absorbancia I y II con $r = -1.00$ en ambas (Tablas 4 y 5).

En síntesis, los resultados bioquímicos sometidos al análisis de variancia, no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos (inmaduros, maduros e intermedios). El análisis de correlación mostró que en el grupo de ovocitos inmaduros hubo correlación significativa entre los niveles de FSH y LH con una $r = 0.414$.

En el grupo de ovocitos maduros se encontró una relación positiva entre la FSH y los niveles de absorbancia con una $r = -0.586$.

En el líquido folicular de ovocitos intermedios se encontró correlación significativa entre un mayor número de parámetros como: FSH y LH con una $r = 0.924$, FSH con proteínas $r = 0.763$, FSH con nivel de absorbancia II $r = 0.840$; LH con Proteínas $r = 0.703$; LH y absorbancia II con una $r = 0.894$; Fác y niveles de absorbancia II con $r = -0.960$; E_2 con proteínas $r = 0.771$; E_2 con los niveles de absorbancia I y II $r = -1.000$ para ambas. Los niveles de proteínas mostraron correlación significativa con los niveles de absorbancia I y II con $r = -1.00$.

TABLA 4

ANALISIS DE CORRELACIÓN DE PEARSON

OVOCITOS INMADUROS

	F. ác	LH	FSH	Proteínas	Estradiol
LH	-0.302				
FSH	-0.325	0.414			
Proteínas	0.202	0.095	0.251		
Estradiol	-0.182	-0.104	-0.233	0.272	
Absorbancia	-0.173	0.149	0.268	-0.015	0.112

OVOCITOS MADUROS

	F. ác	LH	FSH	Proteínas	Estradiol
LH	0.203				
FSH	0.131	0.176			
Proteínas	0.294	-0.062	0.114		
Estradiol	-0.159	-0.091	-0.081	0.171	
Absorbancia	0.018	-0.065	-0.586	-0.125	-0.211

OVOCITOS INTERMEDIOS

	F. ác	LH	FSH	Proteínas	Estradiol	Absorbancia
LH	-0.097					
FSH	-0.099	0.924				
Proteínas	-0.208	0.703	0.763			
Estradiol	-0.099	0.303	0.411	0.771		
Absorbancia	-0.601	-0.081	-0.488	-1.001	-1.001	
Absorbancia II	-0.961	0.894	0.841	-1.001	-1.001	-0.281

TABLA 5**Valores críticos de r**

n	r.025	r.005	n	r.025	r.005
3	0.997		18	0.468	0.59
4	0.95	0.999	19	0.456	0.575
5	0.878	0.959	20	0.444	0.561
6	0.811	0.917	21	0.433	0.549
7	0.754	0.875	22	0.523	0.537
8	0.707	0.834	27	0.381	0.487
9	0.666	0.798	32	0.349	0.449
10	0.632	0.765	37	0.325	0.418
11	0.602	0.735	42	0.304	0.393
12	0.576	0.708	47	0.288	0.372
13	0.553	0.684	52	0.273	0.354
14	0.532	0.661	62	0.25	0.325
15	0.514	0.624	72	0.232	0.302
16	0.497	0.623	82	0.217	0.283
17	0.482	0.606	92	0.205	0.267

Gráfica tomada del libro de Estadística de Freund 1986

VI DISCUSIÓN.

Testard (1983), ha reportado que en ciclos ovulatorios espontáneos la madurez meiótica de los ovocitos está asociada con un incremento en el grado de expansión y mucificación del cumulus y corona radiada. Después de la elevación endógena de LH, la meiosis prosigue y el cumulus y las células de la corona radiada simultáneamente se expanden y se mucifican. Sin embargo en ciclos estimulados, sin GnRH el inicio de la meiosis y la expansión del cumulus se presentan de forma asincrónica tal como lo ha reportado Laufer en 1984, Bomsel- Helmreich en 1987 y Veeck en 1988.

En este estudio la asincronía entre la morfología del cumulus y la madurez nuclear, se presentaron como ya se describió. Se sabe que la inseminación antes de la madurez del ovocito, puede resultar en una o varias fallas como son la descondensación de la cabeza del espermatozoide, o falla del ovocito para activarse con retención del segundo cuerpo polar, además puede presentarse polispermia, y/o condensación prematura de los cromosomas del espermatozoide; mientras que la inseminación tardía puede resultar en poliploidía y/o activación partenogénica.

Estas condiciones producen segmentaciones irregulares, fallas en la implantación o abortos espontáneos (Hammit, 1993).

Por otro lado, se piensa que la incidencia de poliploidía de ovocitos postmaduros que se encuentran en Metafase II y que presentan un grado muy bajo de fertilización, puede ser causada por un defecto en la liberación de los gránulos corticales y por consiguiente falta de bloqueo de la polispermia, o bien fallas en la separación del segundo cuerpo polar después de la fertilización.

En este estudio en la clasificación morfológica inicial al evaluar los ovocitos al microscopio de luz, encontramos que algunos de los ovocitos inmaduros e intermedios estuvieron mal clasificados lo cual se comprobó al correlacionar su clasificación con el barrido espectrofotométrico (Tabla 1).

Esto puede ser la explicación para aquellos ovocitos que no pudieron evolucionar "in vitro", y aún más para los que fueron transferidos y que no tuvieron la oportunidad de madurar.

La madurez del ovocito puede ser obtenida en cultivo por diferentes métodos ampliamente reportados en la literatura (Dandekar, 1991), sin embargo, el criterio para reconocer con claridad ovocitos maduros e inmaduros presenta dificultades causadas por la misma sincronía, por lo que es fundamental contar con una herramienta mas adecuada para clasificar y cultivar a estos ovocitos y lograr que progresen y desarrollen un embrión.

Ha sido reportado que ovocitos con un Lf. que presenta un pico de máxima absorbancia a 450 nm, tienen mayores probabilidades de ser fecundados y segmentar, lo cual indica que se trata de ovocitos maduros, mientras que los que presentaron un pico a 415 nm., no fecundaron, por lo que son considerados como ovocitos inmaduros (Bayer, 1990).

Las diferencias en el tamaño del folículo durante la laparoscopia no se pueden correlacionar con la madurez del ovocito, ya que no es posible en esos momentos, medir el tamaño real del folículo y el cirujano sólo se concreta a realizar su trabajo lo mas rápido posible, para evitar demasiado tiempo de anestesia a la paciente y evitar daño a los folículos, ya que el exceso de exposición al anestésico podría inhibir el potencial de desarrollo de los ovocitos (Osborn 1993, Soussis 1995).

Por lo que respecta a las diferencias en el contenido bioquímico del Lf. entre grupos, éstas no fueron tomadas en cuenta, ya que en algunas ocasiones parte del volumen del Lf., se pierde durante la captura.

Como en otras especies, los ovocitos humanos no estimulados, dependen de su tamaño para tener la capacidad de reanudar la meiosis y completar su maduración. Se ha sugerido que esto es un doble proceso en el cual primero se adquiere la capacidad para reanudar la meiosis, y subsecuentemente la capacidad para completar la maduración meiótica. Shultz y Wassarman en 1977 (Durinzi, 1995), encontraron que el crecimiento de los ovocitos de ratón se acompaña por cambios significativos en el tipo de proteínas sintetizadas en cada estadio, además el metabolismo de los ovocitos cambia durante su crecimiento como lo indica el incremento en la actividad total de enzimas como la lactato deshidrogenasa y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. También se ha demostrado que los cambios meióticos se caracterizan por modificaciones coordinadas en estadios específicos a nivel nuclear y a nivel citoplásmico.

Se han hecho trabajos en donde se demuestra la influencia de los componentes citoplásmicos sobre la maduración nuclear, inyectando el citoplasma de ovocitos en Metafase II a ovocitos en Profase I, encontrando que estos últimos llegaban a la maduración y a la fecundación en un porcentaje mayor que el grupo control (Durinzi, 1995).

El barrido espectrofotométrico del Lf de ovocitos maduros concuerda con lo reportado en la literatura, ya que en cada uno de ellos el pico de máxima absorbancia se encontró a $456.8 \text{ nm.} \pm 2.38$, lo que significa que la morfología de éstos resulta fácil de reconocer al microscopio, pero que es necesario tener otros marcadores para clasificar mas adecuadamente a estos ovocitos para diferenciarlos de los intermedios e inmaduros en los cuales, las características citoplásmicas no resultan claras para su definición.

La evolución de los ovocitos en cultivo fue registrada en la tabla 2, en la que se muestra que solo 4 de 14 ovocitos inmaduros fueron fecundados y se desarrollaron hasta el estadio de cuatro blastómeras; en el grupo de maduros, 10 de 16 ovocitos evolucionaron a cuatro blastómeras y ninguno del grupo de intermedios pudo evolucionar. Esta falla fue debida en forma fundamental a una clasificación errónea de los ovocitos y por tanto a tiempos inadecuados de inseminación.

Es importante resaltar que la absorbancia del Lf. alrededor de 450 nm. puede ser alterada por moléculas del tipo de las bilirrubinas o de los beta carotenos, que como se sabe son precursores de la vitamina A, que posiblemente esté involucrada en la biosíntesis de mucopolisacáridos, que llegan al Lf. por difusión del suero sanguíneo durante el crecimiento del folículo (Bayer 1990).

No se sabe en que forma pueden influir estos pigmentos en el desarrollo de ovocitos a embrión, pero resulta importante hacer notar que la concentración de estas sustancias presenta variaciones, que podrían explicarse por la acumulación de estos compuestos, o que por una mayor vascularización del folículo durante su crecimiento y por ende una mayor difusión desde el plasma sanguíneo hacia el Lf. como por un aumento en el metabolismo interno del propio folículo.

Por otro lado se sabe que las proteínas presentes en el Lf. proceden del plasma sanguíneo por transporte a través de la membrana (Shalgi, 1973). Los niveles de proteínas en los diferentes grupos formados corresponden de acuerdo al análisis de Mann-Whitney (Freund, 1986) a una misma población de folículos con diámetros entre 20 y 24 mm. por lo que las variaciones entre un grupo y otro no son significativamente diferentes.

Henderson (1990), reporta que los niveles de fosfatasa ácida son elevados en folículos pequeños y atrésicos y que disminuyen en los folículos antrales y preovulatorios. En este trabajo, no se puncionaron folículos pequeños, y los ovocitos atrésicos encontrados presentaron líquido folicular hemático, por lo que no se incluyeron en este estudio.

Al analizar el contenido de F.ác. en ovocitos maduros e inmaduros (folículos antrales), no se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos, mientras que en los ovocitos intermedios, la cantidad de F.ác. es significativamente mayor que en los grupos maduros e inmaduros; además en este grupo, los niveles de gonadotropinas (FSH y LH), son ligeramente mas elevados y se ha reportado que las altas concentraciones de éstas sustancias incrementan las fosfatasas tanto alcalina como ácida. Las altas concentraciones de F.ác. encontradas en Lf pueden limitar su capacidad para responder a las gonadotropinas y por tanto, no llegar a la madurez. Los ovocitos intermedios cultivados e inseminados, no presentaron ningún tipo de cambios lo cual concuerda con los datos mencionados anteriormente.

Se ha sugerido que las gonadotropinas dentro del Lf juegan un papel fundamental en la maduración del ovocito. En ciclos inducidos se ha encontrado que estas gonadotropinas causan una asincronía entre la maduración del COCC, el desarrollo del núcleo y el citoplasma del ovocito. Por lo que respecta a la FSH, los niveles se mantuvieron similares en los tres grupos como se observa en la tabla 3, mientras que la LH tiene la tendencia de incrementarse tal como lo han descrito varios autores, al presentarse la elevación de gonadotropinas en los folículos preovulatorios.

El contenido de esteroides del Lf humano, ha sido estudiado como un marcador del estado de madurez del ovocito y se encontró que los que derivaban de folículos que contenían grandes concentraciones de estradiol, daban origen a embarazos exitosos en FIV. Este alto grado de correlación entre la madurez del ovocito y la concentración de hormonas esteroideas, no siempre es reproducible ya que dependen fundamentalmente del protocolo de inducción utilizado para obtener una ovulación múltiple, el cual repercute en los niveles hormonales séricos e intrafoliculares (Vargyas, 1982; Berger, 1987). En el ovario, el colesterol es la principal fuente de substratos para la esteroidogénesis. Las células ováricas obtienen el colesterol principalmente tomándolo de las lipoproteínas de la circulación. En este estudio, los niveles de estradiol encontrados en los tres diferentes grupos, no mostraron diferencias significativas.

VII. CONCLUSIONES

Es fundamental poder determinar de forma cada vez mas clara y rápida la madurez del ovocito en los programas de reproducción asistida, a fin de poder darle el tiempo adecuado para que progrese, pueda ser fecundado en el mejor momento y así llegue finalmente al desarrollo del embrión deseado.

Se sabe que hay una relación directa entre las gonadotropinas presentes en el líquido folicular y la maduración del ovocito, pero en los programas empleados, se presenta una asincronía entre la maduración del COCC y la evolución del núcleo y citoplasma del ovocito, también se conoce que existe un alto grado de correlación entre la madurez del ovocito y la concentración de hormonas esteroideas, pero los resultados no son siempre reproducibles.

En este trabajo se observó que al hacer el análisis espectrofotométrico, los Lf con pico de máxima absorbancia alrededor de 456nm corresponden a la clasificación de ovocitos maduros pues tienen mayores posibilidades de fecundar y segmentar, mientras que los Lf con picos de máxima absorbancia a 413nm a 416nm corresponden a los grupos de ovocitos inmaduros e intermedios y es necesario tener otro marcador para clasificarlos y tratarlos.

El tiempo que se lleva hacer la determinación de F.ác., E₂ y gonadotropinas, es demasiado largo para un acto quirúrgico en el que no se puede retener por tiempos prolongados a las pacientes, resultando más práctico realizar el barrido espectrofotométrico del Lf, que permite clasificar de forma rápida y adecuada a los ovocitos, para darles un adecuado seguimiento y manejo posterior.

El barrido espectrofotométrico ha demostrado ser una herramienta valiosa, reproducible, rápida y con aplicación clínica inmediata, que nos permite conocer las posibilidades de fertilización del ovocito, tanto para aquellos que van a ser usados para transferencia inmediata (GIFT) como para los que van a ser incubados y tratados para FIV, pudiendo acortar o extender el período de incubación previo a la inseminación.

VII APÉNDICES

APÉNDICE I

Técnicas de Radioinmunoensayo

Procedimiento básico de 1.5 horas para muestras séricas.

1.- Marcar 18 tubos en duplicado: T = conteo total, NSB = unión no específica A = máxima unión
B a G = muestras séricas de pacientes.

Calibrador	WHO 2o. IRP-HMG mIU/ml.	WHO 2o. IS 80/552
		WHO 1o. IRP 68/40 mIU/ml.
A(MB)	0	0
B	3	1.8
C	10	6
D	20	12
E	40	24
F	100	60
G	200	120

2.- Pipetear 200µl. del calibrador 0 A en los tubos NSB y A y 200 µl. de cada uno de los calibradores en los tubos B-G. Pipetear 200µl. del suero de cada paciente y del control en los tubos ya preparados. Las muestras séricas de los pacientes que se espera contengan altas concentraciones deberán ser diluidas en el calibrador 0 antes del análisis.

3.- Agregar 100µl. de antisuero de LH o FSH a todos los tubos excepto a los marcados NSB y T. Agitar usando un Vortex. Todos los tubos excepto el NSB y el T deben estar con luz azul. Se recomienda el uso de un pipeteador de repetición tipo Eppendorf.

4.- Incubar 30 min. a 37° C. Usar un baño de agua o un bloque caliente si no se cuenta con un horno.

5.- Agregar 100 µl. de ¹²⁵I LH o de ¹²⁵I FSH. Agitar por Vortex. Todos los tubos deberán ser púrpuras excepto para los tubos NSB y T los cuales deberán ser rojos. Quitar los tubos T para contarlos hasta el paso 10 ya que no requieren procesos posteriores.

6.- Incubar por 60 in, a temperatura ambiente.

7.- Agregar 1 ml. de la solución de precipitación a todos los tubos y agitar por Vortex.

Para agregar este mililitro se recomienda el uso de un pipeteador tipo Eppendorf. Todos los tubos deberán ser púrpuras excepto los tubos NSB, los cuales serán azules oscuro.

8.- Centrifugar 15 min. a 3000 x/g.

9.- Usar una gradilla para decantar o aspirar el sobrenadante, reteniendo el precipitado para conteo. Dejar los tubos invertidos sobre un papel absorbente por 10 minutos. Después remover con un isopo y de manera cuidadosa todas las gotas residuales.

10.- Contar cada tubo durante un minuto en un contador para ¹²⁵I

11.- Para calcular las concentraciones primero se calcula para cada par de tubos el promedio de cuentas por minuto corregidas por el conteo de los tubos NSB:

Conteo neto = Promedio de CPM - Promedio de cuentas de NSB

Después de determinar la unión a cada par de tubos como un porcentaje de máxima unión (MB), con el conteo corregido del NSB de los tubos A tomados como 100%

Porcentaje de unión = $(\text{Conteo neto} / \text{Conteo neto de MB}) \times 100$

Utilizar el papel para gráfica logit-log que viene en el equipo, graficar el porcentaje de unión sobre el eje vertical contra concentración sobre el eje horizontal para cada una de los calibradores excepto A (MB) y dibujar una línea recta para unir a cada uno de esos puntos. Las concentraciones de LH para las muestras séricas pueden ser calculadas por líneas de interpolación.

Se recomienda tener en cuenta los siguientes datos de las medidas eficaces:

T = Conteo total (como cuentas por minuto)

$\%NSB = 100 \times (\text{Promedio del conteo de NSB} / \text{Conteo total})$

$\%MB = 100 \times (\text{Conteo neto de MB} / \text{Conteo total})$

Y el 20, 50 y 80 % de intercepción, donde 20% = a la concentración de LH a la unión del 20%, etc.

APÉNDICE 2

Técnicas de Radioinmunoensayo

Determinación cuantitativa de estradiol por radioinmunoensayo ESTR-CTRIA.1

Principio: El principio del análisis está basado en la competencia entre el estradiol marcado con ^{125}I y el estradiol contenido en estándares o especímenes que serán analizados, por un fijo y limitado número de sitios de unión a anticuerpos. Después de la incubación la cantidad de estradiol sin marcar originalmente unido al anticuerpo está inversamente relacionada a la cantidad de estradiol sin marcar presente en la muestra. El método está basado en el uso de tubos recubiertos.

Reactivos:

Cada equipo contiene reactivos para 96 tubos

Tubos cubiertos con anti-estradiol policlonal en el fondo del tubo.

Estradiol- ^{125}I en buffer y colorante azul = £ 93 KBq (=£ 2.5 μCi)

Estándar 0 de suero humano y azida de sodio

Estándares de la A a la F de suero humano, estradiol humano y azida de sodio.

20-70-250-800-2000-5000 pg / ml.

Procedimiento

- 1.- Verter 100 μl de estándares controles y muestras para ser analizados en los correspondientes tubos cubiertos y marcados.
- 2.- Agregar 500 μl de estradiol ^{125}I a cada tubo mezclar suavemente con un Vortex.
- 3.- Incubar a temperatura ambiente 1h 30 \pm 5 min. entre 18 y 25° C. para suero de mujeres sometidas a inducción de la ovulación y 2h 30 \pm 5 min. entre 18 y 25° C para otras aplicaciones.
- 4.- Lavar los tubos como sigue: Aspirar el contenido del tubo tanto como sea posible, agregar 2 ml. de agua a cada tubo, excepto a los tubos T. Vaciarlos y lavar con agua.
- 5.- Medir la radioactividad remanente unida a los tubos con un contador de centelleo gamma.

Resultados

Para cada grupo de tubos, obtener el promedio de conteo después de restar las cuentas de fondo, graficar la curva estándar y leer el valor de las muestras directamente de la curva, corrigiendo los valores leídos por el factor de dilución si es necesario.

APÉNDICE 3

Técnica para determinar proteínas (Lowry):

Reactivos:

1.- Mezcla para la determinación de proteínas

Na ₂ CO ₃ (4%)	100 ml.
Tartrato de sodio y potasio (4%)	1 ml.
Cu SO ₄ (2%)	1 ml.

La mezcla se prepara en el momento en que va a usarse y los reactivos deberán mantenerse en refrigeración por separado.

2.- Estándar de proteínas

Albúmina de suero bovino	50 mg
Agua destilada	100 ml.

La solución se prepara disolviendo completamente la albúmina, se divide en fracciones de 3 ml., se etiquetan y se guardan en el congelador a -20° C. y en cada ocasión solo se saca un tubo para correr una curva de calibración.

3.- Mezcla de reactivo de Fenol.

Reactivo de Fenol	1 ml.
Agua destilada	2 ml.

Esta mezcla se prepara en el momento de usarse

Procedimiento:

- 1.- Preparar tubos para la curva estándar y tubos para cada una de las muestras debidamente etiquetados y por duplicado. Agregar 5 ml. de la mezcla de proteínas.
- 2.- La curva estándar se prepara agregando 100, 200, 400 y 600 µl de albúmina bovina. En los tubos restantes se agrega 0.1 ml. del problema a determinar. Se incuban a temperatura ambiente durante 45 min.
- 3.- Agregar 0.5 ml. de la mezcla de Fenol a cada uno de los tubos y agitar con un vortex para homogeneizar. Dejar en reposo durante 15 min. a temperatura ambiente.
- 4.- Leer la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 660 nm.
- 5.- Trazar una curva con los resultados obtenidos con los estándares y correlacionar por medio de la ecuación de la recta los resultados de las muestras para obtener la concentración de proteínas en cada problema.

APÉNDICE 4

Técnica para determinar Fosfatasa ácida

A.- Fundamento

Las fosfatasas rompen el grupo fosfato del p-nitrofenil fosfato, con formación del p-nitrofenol libre, que en solución ácida diluida es incoloro. En medio alcalino, se transforma en ión nitrofenolato con coloración amarillo intenso, proporcional a la cantidad de enzima presente. La reacción se efectúa durante 30 min. exactamente y se detiene por la adición de hidróxido de sodio que inactiva a la enzima y al mismo tiempo diluye el color del nitrofenolato.

La unidad enzimática se define como el número de milimoles de p-nitrofenol formados en 60 min. por litro de suero.

B.- Material y equipo.

1.-Sustancias

- Ácido cítrico
- Hidróxido de sodio
- Acido clorhídrico
- p-nitrofenil fosfato disódico
- p-nitrofenol.

2.-Reactivos:

- Hidróxido de sodio 0.2 N
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Buffer ácido
- Sustrato en tabletas
- Solución estándar concentrada 10 mM/L

Para preparar las soluciones que se utilizan en el desarrollo de la técnica, hacer lo siguiente:

Sustrato Buffer ácido pH 4.8

Se prepara en el momento de usarse.

Disolver una tableta de stock sustrato en 60 ml. de agua destilada y añadir la misma cantidad de buffer ácido

Solución estándar diluida 0.05 mM/L.

Aforar 5 ml. de la solución estándar concentrada a 1000 ml. con agua destilada

3.- Material y equipo

C.- Método

1.- Material biológico

0.2 ml. de muestra

2.- Técnica:

- a) Marcar tres tubos con los números 1, 2 y 3. Agregar 1 ml. de sustrato buffer ácido precalentando a 37° C los tubos 1 y 2.
- b) Añadir 0.2 ml. de muestra al tubo 2 y 0.2 ml. de agua al tubo 1.
- c) Incubar a 37° C durante 30 min. exactamente.

- d) En el tubo 3, mezclar 5 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N y 0.2 ml. de muestra.
- e) Agregar 4 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N a los tubos 1 y 2. Mezclar por inversión
- f) Leer en 415 nm., ajustar a 100% de transmitancia con el tubo 1 y leer el tubo 2
- g) Ajustar a 100 % de transmitancia con hidróxido de sodio 0.1 N y leer el tubo 3

UNIDADES DE FOSFATASA ACIDA = Unidades del tubo 2-Unidades del tubo 3

3.- Calibración

Tubo numérico	Agua destilada ml.	Hidróxido de sodio 0.2N ml	Solución estándar diluida 0.5 mU/ml.	Unidades ácidas
1	10	1.1	0	0
2	8	1.1	2	0.47
3	6	1.1	4	0.94
4	4	1.1	6	1.40
5	2	1.1	8	1.87
6	0	1.1	10	2.34

Llevar a 100% de T con el tubo número 1 y leer a 415 nm. o en filtro a 410.

4.- Valores normales Fosfatasa ácida:

Masculino 0.13-0.63 unidades
Femenino 0.01-0.56 unidades

APÉNDICE 5

Medio de cultivo F10

Es un medio que contiene las óptimas concentraciones para el crecimiento clonal de células ováricas de Hamster chino. Actualmente es un medio de uso popular para el crecimiento de células altamente diferenciadas. Está compuesto por los siguientes ingredientes:

Ingrediente	mg/L	Ingrediente	mg/L
L-Alanina	8.91	Inocitol	0.541
L-Arginina-HCl	210.7	Nicotinamida	0.611
L-Asparagina-H ₂ O	15.01	Piridoxina-HCl	0.206
L-Ácido Aspártico	13.31	Riboflavina	0.376
L_Cisteina-HCl	31.53	L-Ácido Glutámico	14.71
L-Glutamina	146.2	Tiamina-HCl	1.012
Glicina	7.51	Vitamina B1	1.36
L-Histidina-HCl-H ₂ O	20.96	CaCl ₂ -H ₂ O	44.10
L-Isoleucina	2.62	CuSO ₄ -7H ₂ O	0.0025
L-Leucina-HCl	13.12	FeSO ₄ -7H ₂ O	0.834
L-Lisina-HCl	29.30	KCl	285.0
L-Metionina	4.48	KH ₂ PO ₄	83.0
L-Fenilalanina	4.96	MgSO ₄ -7H ₂ O	152.0
L-Prolina	11.51	NaCl	7400
L_Serina	10.51	Na ₂ HPO ₄	156.2
L-Threonina	3.57	NaHPO ₄	156.2
L-Triptofano	0.61	Na ₂ HCO ₃	1200
L-Tirosina sal disódica-2H ₂ O	2.609	ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.0288
L-Valina	3.51	D-Glucosa	1100
Biotina	0.024	Hipoxantina	4.08
D-Pantotenato de calcio	0.715	Acido lipoico	0.206
Cloruro de Colina	0.698	Piruvato de sodio	110.0
Ácido Fólico	1.32	Timidina	0.727
Sal sódica de Rojo fenol	1.240		

APÉNDICE 6

(Tomado del libro de Estadística 4a. Ed. J. E. Freund/R. Manning Smith 1989)

Prueba del significado de r

El coeficiente de correlación de una población, se representa por medio de la letra griega ρ (rho minúscula). Lo que r mide para una muestra, ρ mide para una población. En ocasiones cuando se calcula r sobre la base de datos de una muestra, se puede tener una correlación positiva o negativa fuerte puramente por oportunidad, aunque en realidad no exista ninguna relación entre las dos variables que se consideran. Cuando se calcula un coeficiente de correlación a partir de los datos de una muestra, el valor que se obtiene de r es solo una estimación de un parámetro correspondiente.

Para demostrar la hipótesis nula de no-correlación, se rechaza la hipótesis nula de no-correlación si $r < -r_{\alpha/2}$ ó bien $r > r_{\alpha/2}$ donde el valor de este término se puede obtener en la tabla 3 para $\alpha = 0.005$ y 0.025 . Si se puede rechazar la hipótesis nula, se dice que existe una correlación significativa, en caso contrario se dice que el valor de r no es estadísticamente significativo.

Por ejemplo, la r localizada para FSH al correlacionarla con los valores del pigmento amarillo medido en el Lf como absorbancia en ovocitos maduros, dio una $r = -0.586$.

Solución 1. Hipótesis $H_0: \rho = 0$

$$H_A: \rho \neq 0$$

2. Nivel de significado

$$\alpha = 0.05$$

3. Criterio.

Rechace la hipótesis nula si $r < -0.487$ o $r > 0.487$ donde este es el valor de r 0.025 para $n = 29$; en caso contrario afirme que el valor de r no es significativo.

4. Cálculos.

$$r = -0.586$$

5. Decisión.

Como $r = -0.586$ no está en el intervalo de -0.487 a 0.487 por tanto se rechaza la hipótesis nula; en otras palabras el coeficiente de correlación de -0.586 es significativo a nivel de 0.005 , lo cual quiere decir que la cantidad del pigmento amarillo presente en el líquido folicular está influenciado por el efecto de la FSH sobre el folículo en forma inversamente proporcional. De esta misma forma se validaron todas las r encontradas al realizar el análisis de Pearson.

IX ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CBG	Globulina transportadora de cortisol
CC	<i>Citrato de clomifeno o clomifen</i>
COCC	Complejo ovocito-corona radiata-cumulus
CPM	Cuentas por minuto
DNA	Acido desoxirribonucleico
E ₂	Estradiol
F.ác	Fosfatasa ácida
FIV	Fertilización in vitro
FIVTE	Fertilización in vitro y transferencia de embriones
FSH	Hormona foliculo estimulante
GIFT	Gamete intafalopian transfer, en español corresponde a TIG= Transferencia intratubaria de gametos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GP	Globulo polar o Cuerpo polar
hMG	Gonadotropina menopáusica humana
hCG	Gonadotropina coriónica humana
¹²³ I	Iodo radioactivo
λ	<i>Lambda = Microlitros</i>
Lf	Líquido folicular
LH	Hormona luteinizante
μm	Micrómetros
μl	microlitros
mλ	microlitros
mM	milimolar
mOsm	miliosmolaridad
mUI	miliunidades internacionales
ng/ml	nanogramos por mililitro
nm	nanómetro
OMI	Factor Inhibidor de la Maduración del Ovocito
P ₄	Progesterona
pg/ml	picogramos por mililitro
UI	Unidades internacionales
ZP	Zona pelúcida

X BIBLIOGRAFÍA

- Adams G.P.**, Kot K., Smith C.A., Ginther O.J.: Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim. Reprod Sci.* 1993; 30: 259-271
- Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. *Germ cells and Fertilization: En Molecular Biology of the Cell. Second Ed.* Garland Publishing Inc. New York and London, 1989, 839-863
- Amsterdam A.**, Plehn-Dujowich D., Suh B.S.: Structure-Function relationships during differentiation of normal and oncogene-transformed granulosa cells. *Biol. Reprod* 1992; 46: 513-522
- Asch R.H.**, Li H.P., Yovich J.I., Katayama K.P., Balmaceda J.P., Rojas F.J., Stone S.C.: Failed oocyte retrieval after lack of human chorionic gonadotropin administration in assisted reproductive technology. *Fertil. Steril* 1992; 58: 361-365
- Baker T. G.** *Oogenesis and ovulation en Germ cells and fertilization ed.* Austin C. R. & Short R. V. 1972; 2: 40.
- Bayer S.R.**, Ransil B.J., Shelton S.J., Armant D.R.: Spectrophotometric analysis of follicular fluid related to oocyte fertilization, embryo cleavage and follicular fluid protein and hormone content. *Fertil. Steril* 1990; 54: 606-611
- Bayer S. R.**, Zeind A.J., Turksoy R.N., Emmi A.M., Reindollar R.H.: Further study and characterization of the yellow pigments in follicular fluid that are related to oocyte quality. *Fertil. Steril.* 1992; 58: 964-969
- Berger M.A.**, Laufer N., Lewin A., Navot D., Rabinowitz R., Eisenberg S., Margalioth E., Schenker J.: Cholesterol and Steroid levels in human follicular fluids of human menopausal gonadotropin-induced cycles for in vitro fertilization. *J. Vitro. Fert and Embryo Transfer.* 1987; 4 (1): 30-33
- Bomsel-Helmreich O.**, Huyen L.V.N., Durand-Gasselín I., Salat-Baroux J., Antoine J.M., Timing of nuclear maturation and cumulus dissociation in human oocytes stimulated with clomiphene citrate, human menopausal gonadotropin, and human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1987; 48: 586-595
- Bonilla-Musoles F.**, Simón C., Raga F., Blanes J.: Endosonografía e infertilidad en *Avances en Reproducción Asistida.* Editores Remohi J., Pellicer A., Bonilla-Musoles F.: Ed. Díaz de Santos 1992; 401-434
- Brown J.B.**, Gronow M.: Endocrinology of ovulation prediction. En *Clinical Reproductive Endocrinology* Edited by Rodney P. Shearman 1985; 165-184
- Byсков, A.G.**, Regulation of meiosis in mammals, *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 1979; 19: 1251
- Calderon I.** Healy D.: Endocrinology of IVF. Chap. 1: *Handbook of in vitro fertilization* Ed. CRC Press 1993; 1-16
- Dandekar P.V.**, Quigley M.M.: Laboratory setup for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42: 1-12
- Dandekar P.V.**, Martin M.C., Glass R.H.: Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil Steril* 1991; 55: 95-99
- Danforth D.R.**: Endocrine and paracrine control of oocyte development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1995; 172: 747-752.

- Diedrich K.**: La tranferencia embrionaria tubárica transvaginal. En Avances de reproducción asistida Ed. Díaz de Santos, S.A.cap 1992; 18: 301-312
- Di Paola G.**, Procaccini J.C.: Enfoque de la pareja estéril. Avances en reproducción humana. Asch R. y Acosta A. Editorial Médica Panamericana. 1992; 11-20
- Durinzi K.L.**, Saniga E.M., Lanzendorf S.E.: The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil. Steril.* 1995; 63: 404-406
- Edwards R.G.**, Fishel S.B., Cohen J., Fehilly C. B., Purdy J.M., Slater J.M., Steptoe P.C. Webster J.M.: Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviation human infertility. *J. In Vitro Fert Embryo Transfer* 1984; 1: 3-23
- Elfont E.A.**, Roszka J.P., Dimino M.J.: Cytochemical studies of acid phosphatase in ovarian follicles: A suggested role for lysosomes in steroidogenesis. *Biol Reprod* 1977; 17: 787-795
- Freund J. E.**, Manning S.R., Estadística, Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. 1986; 517-518
- Ghersevich S.A.**, Poutanen M.H., Martikainen H.K., Vihko R.K.: Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa cells: Correlation with follicular size, cytochrome P450 aromatase activity and oestradiol production. *J. Endocrinol* 1994; 143: 139-150
- Gondos B.** Granulosa cell-germ cell relationship in the developing rabbit ovary. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1970; 23: 419- 426
- González M.D.**, Téllez M.J., Guzmán G.F., García L.A., Murrieta S., Alvarado D.A.: Aspectos morfológicos de la maduración ovular en un programa de fertilización "in vitro" y transferencia de gametos del IMSS. *Arch Invest. Méd (Méx).* 1988; 19: 213-223
- Greenwald S.G.**: Exogenous progesterone influence on ovulation and hormone levels in the cyclic hamster. *J. Endocr.* 1977; 73: 151-155
- Hafez E.S.E.**, Reproducción e inseminación artificial en animales. Interamericana Mc. Graw Hill, 1987; 5:91-116, 7: 142-181
- Hammitt D. G.** , Syrop C. H., Van Voorhis B.J., Walker D.L., Miller T.M., Barud K.M.: Maturational asynchrony between oocyte cumulus-coronal morphology and nuclear maturity in gonadotropin-releasing hormone agonist stimulations. *Fertil Steril* 1993; 59: 375-381
- Henderson K.A.**, Cupps P.T.: Acid and alkaline phosphatase in bovine antral follicles. *J. Anim. Sci.* 1990; 68: 1363-1369
- Hill G.A.**, Freeman M., Bastias M.C., Rogers B.J., Herbert C.M., Osteen K.G., Wentz A.C.: The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1989; 52: 801-806
- Hughes F.M.**, Gorospe W.C.: Biochemical identification of apoptosis(programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinol* 1991; 129: 2415-2422
- Hussein A.**, Facog R.M., Brinson A.O.: Preovulatory granulosa cells and steroidogenesis. An ultrastructural study in the rhesus monkey. *Obstet Gynecol.* 1976; 47: 562-568
- Kaplan , S.L.** and Grumbach, M.M., The ontogenesis of human foetal hormones . II Luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH), *Acta endocrinol.* 1976; 81: 808-829
- Kaufman M.H.**, Fowler R.E., Barratt E., McDougall R.D.: Ultrastructural and histochemical changes in the murine zona pellucida during the final stages of oocyte maturation prior to ovulation. *Gamete Res.* 1989; 24: 35-48

- Laufer N., Botero-Ruiz W., DeCherney A.H., Haseltine F., Polan M.L., Behrman H.R.:** Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984; 58: 430-434.
- Laufer N., Tarlatzis B.C., De Cherney A.H., Masters J.T., Haseltine F.P., MacLusky N., Naftolin F.:** Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42: 366-372
- Langman J., Sadler T.W.:** De la Ovulación a la implantación. *Embriología Médica Ed Panamericana* 1986; 30-32
- Lipner H.:** Mechanism of mammalian Ovulation en *The Physiology of Reproduction*. 2a ed Knobil E, Neil J.D. Raven Press, Ltd, N.Y. 1988; 12: 447-487
- Lopata A.:** Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1983; 40: 289-301
- Lopata A., Hay D.L.:** The surplus human embryo: its potential for growth, blastulation, hatching, and human chorionic gonadotropin production in culture. *Fertil Steril* 1989; 51: 984-991
- Lowry O. H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.:** Protein Measurement with the folin phenol reagent *J. Biol Chem* 1951; 193: 265-275
- Makris A., Ryan K. J.:** Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology*, 1975; 96: 694-701
- Maxson W.S., Haney A.F., Schomberg D.W.:** Steroidogenesis in porcine atretic follicles. Loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol Reprod.* 1985; 33: 495-501
- McNatty K. P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R., Ryan K. J.:** The production of progesterone, androgens and estrogens by granulosa cells, thecal tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1979; 49: 687- 699
- Merchant L.H. :** Ovarian differentiation en "The vertebrate ovary". *Comparative biology and evolution*. Ed. R. E. Jones. 1978; 2: 47-81
- Merchant L.H., Coello J.:** The effect of busulfan on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. *Cell differentiation* 1979; 8: 145-155
- Moore K.L.:** *Embriología clínica*. Interamericana Mc. Graw Hill 1989; 2: 14-40
- Okamura H., Takenaka A., Yajima Y., Nishimura T.:** Ovulatory changes in the wall at the apex of the human Graafian follicle. *J. Reprod. Fert.* 1980; 58: 153-155
- Osborn J.:** Oocyte retrieval and maturation en " *Handbook of in vitro fertilization*" Ed. Trounson A., Gardner D. K.: CRC Press. 1993; 2: 17-31
- Pellicer A., Polan M.L., De Cherney A.:** La mejora de la calidad del ovocito mediante la mejora del régimen de inducción de la ovulación. En " *Avances en reproducción asistida*". Ed. Díaz de Santos S. A. 1992; 57-71
- Rabinovici J., Blankstein J., Goldman B., Rudak E., Dor Y., Pariente C., Geier A., Lunenfeld B., Mashiach S. :** In vitro fertilization and primary embryonic cleavage are possible in 17 α -hydroxylase deficiency despite extremely low intrafollicular 17 β -estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989; 68: 693-697
- Revelli A., La Sala G. B., Gallicchio D., Modotti M., Piffaretti-Yañez A., Massobrio M., Balerna M.:** Effect of peritoneal fluid, follicular fluid and their volumetric mixture on acrosomal reactivity in vitro. *Fertil Steril* 1995; 63: 200-203
- Rossavik I. K., Gibbons W.E.:** Variability of ovarian follicular growth in natural menstrual cycles. *Fertil Steril* 1985; 44: 195-199

- Rotsztein D.A., Asch R.H.:** Edad y fertilidad. En "Avances en reproducción asistida" Editorial Díaz de Santos S.A.1992; 339-351
- Sabeur K., Edwards D.P., Meizel S.:** Human sperm plasma membrane progesterone receptor(s) and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 993-1001
- Seegar J.G.:** Estimulación e inducción a la ovulación: LHRH, Gonadotropinas y clomifeno. En "Avances en Reproducción humana" Editores Asch R., Acosta A. Ed. Med. Panamericana S. A., 1988; 192-198
- Seibel M.M., Smith D.M.:** The effect of clomiphene citrate on human preovulatory oocyte maturation in vivo. *J. in vitro Fertil. Embryo Transfer* 1989; 6: 3-6
- Shalgi R., Kraicer P., Rimon A., Pinto M., Soferman N.:** Proteins of human follicular fluid: The blood-follicle barrier. *Fertil. Steril.* 1973; 24: 429-434
- Soussis I., Boyd O., Paraschos T., Duffy S., Bower S., Troughton P., Lowe J., Grounds R.:** Follicular Fluid levels of midazolam, fentanyl, and alfentanil during transvaginal oocyte retrieval. *Fertil. Steril.* 1995; 64 (5): 1003-1007
- Télez M. J., Wenz F. M.A., Pascual B.A., García L.A., Manterola A.D.:** Maduración del ovocito y su relación con algunos componentes del líquido folicular. *Ginec. Obst. Méx.;* 1994; 62: 107-112
- Testart J., Frydman R., De Mouzon J., Lassalle B., Belaisch JC.:** A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. Influence of ovarian stimulation upon the number and condition of oocytes collected. *Biol. Reprod.* 1983; 28: 415-424
- Trounson A.O., Leeton J.F., Wood C., Webb J., Wood J.:** Pregnancies in humans by fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. *Science,* 1981; 212: 681-682
- Van Blerkom J. and Motta P.:** The ovary prior to ovulation. The cellular Basis of mammalian reproduction Ed. Urban & Schwarzenberg. Baltimore-Munich 1979: 5-18
- Vargyas J.M., Marrs R.P., Kletzky O.A., Mishell D.R.:** Correlation of ultrasonic measurement of ovarian follicle size and serum stradiol levels in ovulatory patients following clomiphene citrate for in vitro fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1982; 144: 569-573
- Veck L.L.:** Oocyte assessment and biological performance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1988; 541: 259-274
- Veck L.L.:** Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio FIV. En Avances en Reproducción asistida. Ed. Díaz de Santos S.A. 1992; 117-161
- Wallach E.E.:** General aspects of reproduction. En "Modern trends in infertility and conception control". Ed. Wallach E. E. and Kempers R. D. The American Fertility Society. 1988; 4: 1-119
- Wassarman P.M.:** Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; 57: 415-442
- Wassarman P.M., Albertin F.D.:** The mammalian ovum. en "The Physiology of reproduction" 2a Ed. editado por Knobil E. Neill J.D. Raven Press, Ltd., N.Y. 1994; 3: 69-102
- Weisen J.F., Midgley A.R.:** Changes in expression of connexin 43 Gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth. *Endocrinology.* 1993; 133: 741-746

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA