



11217

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
THE AMERICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER I.A.P.



**“ Modelo de Correlación en los Componentes de Activación en el Complejo de Metaloproteinasas [TIMP/(MMP-3/Estromelina-1)] en la Capacidad Generativa Folículo/Embrionaria en Respuesta a la Administración Exógena de Hormona Folículo Estimulante Recombinante”**

## TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA**

P R E S E N T A

**DR. JULIO GONZÁLEZ COFRADES**

---

Asesor y coordinador de Tesis: Dr. Gerardo Barroso Villa  
Profesor Titular del curso: Dr. Héctor Hugo Bustos  
Profesor Adjunto: Dr. Gabriel Rojas Poceros

México, D. F.

Febrero 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

4

**FIRMAS**



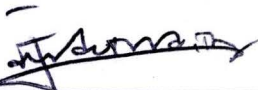
Dr. José Javier Elizalde González  
Jefe de la División de Enseñanza e Investigación  
American British Cowdray Medical Center I.A.P.



Dr. Héctor Hugo Bustos López  
Profesor Titular del Curso de Especialización en  
Ginecología y Obstetricia.  
American British Cowdray Medical Center I.A.P.

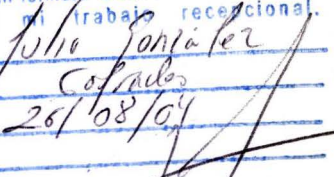


Dr. Gabriel Rojas Poceros  
Profesor Adjunto del Curso de Especialización en  
Ginecología y Obstetricia  
American British Cowdray Medical Center I.A.P.



Dr. Eduardo Ibarrola Buen Abad  
Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia  
American British Cowdray Medical Center I.A.P.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juho González  
Cabrero  
FECHA: 26/08/04  
FIRMA: 



## **TÍTULO**

**“Modelo de correlación en los componentes de activación en el complejo de metaloproteinasas [TIMP/(MMP-3/Estromelina-1)] en la capacidad generativa folículo/embrionaria en respuesta a la administración exógena de hormona folículo estimulante recombinante”**

## ÍNDICE

I	Prólogo y Agradecimientos	1
II	Generalidades	3
	2.1 Anatomía y Fisiología ovárica	4
	2.2 Desarrollo folicular y ovulación	5
	2.3 Endocrinología ovárica	7
III	Introducción	9
	3.1 Factores de contrarregulación homeostática a nivel folicular	10
	3.2 Componentes intrafoliculares	12
	3.3 Mecanismo bioenzimático de metaloproteinasas de matriz	13
	3.4 Relación de la actividad de metaloproteinasas de matriz en los procesos reproductivos	14
IV	Planteamiento del problema	16
V	Justificación	17
VI	Objetivo	18
VII	Hipótesis	19
VIII	Material y Métodos	20
	8.1 Selección y evaluación en ciclos de hiperestimulación controlada	20
	8.2 Ensayo para determinación de Metaloproteinasas	21
IX	Evaluación Estadística	23
X	Resultados	24
XI	Discusión	31
XII	Conclusiones	33
XIII	Bibliografía	34

## **I. Prólogo**

El tratar de realizar investigación básica durante el periodo de entrenamiento de la especialidad resulta complejo ya que generalmente no tenemos tiempo suficiente para este tipo de actividades, sin embargo en mi residencia siempre me alentaron para realizar y participar en trabajos que aportaran una gota mas de conocimiento a la ciencia médica y esa parte se la debo al Dr. Héctor Hugo Bustos, Jefe de Enseñanza del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico ABC, quien siempre ha sido entusiasta en el área de investigación.

En realidad pocos son los médicos que dedican parte de su esfuerzo por aportar un conocimiento nuevo a la comunidad médica y el propósito de esta obra es precisamente el de contribuir en este contexto.

Para hablar de metaloproteinasas de matriz en el líquido folicular humano y su interrelación en los procesos de foliculogénesis y ovulación es necesario tener un conocimiento amplio de la anatomía, embriología, fisiología y endocrinología ovárica y es por ello que la primera parte de esta obra abarca superficialmente los principios básicos en estas áreas. La segunda parte introduce al lector para entender los mecanismos y factores de contrarregulación homeostática a nivel folicular, reconocer cuales son los componentes intrafoliculares y su expresión relacionado a la vascularidad folicular así como la relación de las metaloproteinasas de matriz en los procesos reproductivos. La tercera y última parte es la propia investigación donde encontrará un pequeño aporte a la medicina.

Aunque parezca sencillo se requiere de la participación de muchas personas para llegar a la terminación de una Tesis, por tal motivo quiero agradecer en primer lugar al Dr. Gerardo Barroso Villa quien actualmente es Jefe de la Unidad de Reproducción Asistida de Perinatología y Miembro del Staff del Centro Médico ABC, por compartir sus conocimientos, darme su apoyo y ver la ciencia como parte rutinaria de la vida. A la Dra. Clara Corona de Lau, Jefa de Laboratorio en la Clínica Lomas Altas por el apoyo otorgado para la determinación de inhibidores de metaloproteinasas y las Dras. Belén Aguilar y Yadira Rosario por su participación en el laboratorio de In-vitro.

A todos ellos estoy agradecido ya que sin su apoyo no habría podido concluir mi especialidad.

Gracias

## AGRADECIMIENTOS

A través de estos magníficos años de especialidad he recibido la ayuda de muchas personas, todas ellas importantes en mi vida y dada la brevedad de este texto les pido una disculpa a todas aquellas que no haga mención personalmente.

Como principio de vida quiero agradecer a mis Padres por todo aquello que jamás podré compensar, gracias por vuestro amor, paciencia, confianza y apoyo que durante estos años nunca me faltaron y por mostrarme el lado humano de la vida para ofrecérselo a los demás.

A mi colega Blanca, compañera inseparable y amor de mi vida por siempre hacerme ver hacia delante en los momentos difíciles. A ti que me has hecho sentir a través de tú vientre nuestro nuevo fruto, quiero agradecerte de todo corazón.

Mi hija Amarell que incondicionalmente me ha entregado su amor, me ha dado las fuerzas para luchar y ha sido mi inspiración para terminar esta etapa y continuar con la siguiente.

Quiero compartir este logro con mi hermana Arancha que a pesar de la distancia siempre has estado a mi lado y mi hermano Mauricio por que siempre has creído en mí dándome tu apoyo, confianza y generosidad.

Todos estos años no hubieran sido posibles sin un buen grupo de residentes y quiero darle las gracias a cada uno de ellos por compartir esta experiencia conmigo, especialmente al Dr. Alejandro Avendaño y al Dr. Mario Morales por su calidad medica y gran amistad forjada en estos años de enseñanza.

Todo los conocimientos se los debo a mi Institución, The American British Cowdray Medical Center I.A.P. donde me abrieron las puertas y realicé mi especialidad, además a todos aquellos médicos del Servicio de Ginecología y Obstetricia, en especial al Dr. Carlos Navarro Martínez quien influyo importantemente en la decisión de estudiar esta residencia médica y siempre estuvo pendiente de mi desempeño. Al Dr. Héctor Hugo Bustos Jefe de Enseñanza del Dpto. Ginecología y Obstetricia por su dedicación al curso y preocupación por mejorar la calidad de sus residentes. Al Dr. Eduardo Ibarrola, Jefe del Servicio de Ginecología y Obstetricia por enseñarme el arte de la cirugía y cualidades de un buen cirujano, además de su apoyo en los momentos difíciles. Al Gabriel Rojas Poceros Sub-Jefe de Enseñanza de Ginecología y Obstetricia por su dedicación a la enseñanza. Al Maestro. Dr. José Antonio Ruiz Moreno por preservar la esencia de la medicina y saber traasmitirla. El Dr. Etelberto López R. excelente médico y buen amigo por otorgarme su confianza para con sus pacientes. Igualmente agradezco al Dr. Dudley Díaz, Dr. García León, Dr. Humberto Reyes, Dr. Antonio Zaldivar, Dr. Rubén Bolaños, Dr. Guillermo Rocha, Dr. Jaime Cesarman, Dr. Ezequiel Benitez, Dr. Carlos Gálvez, Dr. Pedro Jorba, Dr. Eleuterio Ortiz, Dr. Jacobo Katz, Dr. Emilio Valerio, Dr. Werner Von Der Meden, Dr. Rubén Valdespin, Dra. Teresa Esquinca, Dr. Pablo Fernández, Dr. Hernández Favela y Dr. Ernesto Nava. Por último especial mención al Lic. Heriberto Méndez por hacerme la residencia mas agradable.

Quiero decirles a todos ellos que contribuyeron en forma importante en mi preparación como médico especialista de Ginecología y Obstetricia.

GRACIAS

## II. Generalidades

El proceso de la ovulación es el termino aplicado para los cambios asociados con la formación del estigma, la degradación y fisura de la pared folicular que permiten la liberación del ovocito. La ruptura folicular ocurre con rapidez siendo su duración de 60 a 218 segundos según los estudios realizados por Doyle en diferentes especies animales. El primer informe de este fenómeno biológico fue descrito en 1932 por Carl Hartman, quien propuso la separación del ciclo sexual femenino en 2 fases principales , la folicular y lútea.

El ciclo de 28 días es admitido como el estándar, cuyas fases preovulatoria y postovulatoria son iguales, de 14 días aunque este patrón no es lo que observamos comúnmente en las mujeres. La fase lútea tiende a permanecer estable con una duración de  $14 \pm 2$  días cualquiera que sea la duración del ciclo. El alargamiento de los ciclos es secundario al incremento de la fase preovulatoria que puede variar entre 9 a 45 días. Las evidencias a primera vista sugirieron a la hormona luteinizante (HL) como único estímulo para desencadenar los sucesos en la cascada de la ovulación, actuando sobre el folículo dominante para desencadenar la liberación del ovocito maduro. Algunas otras hormonas como la gonadotropina coriónica humana (HGC) y la hormona folículo estimulante (FSH) son capaces de inducir la ovulación en animales con hipofisectomía. Las gonadotropinas tanto FSH como LH son complementarias para la inducción de la ovulación en ciclos naturales ya que ambas son liberadas en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

A través del tiempo se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el mecanismo de la ruptura folicular como son : crecimiento folicular excesivo, aumento de la presión hidrostática intrafolicular y acción enzimática, siendo esta última la única que ha demostrado una correlación específica.



## 2.1 Anatomía y Fisiología Ovárica

Los ovarios son glándulas localizadas una a cada lado de la pared pélvica lateral justo en el repliegue denominado fosa ovárica, tienen un tamaño promedio de 4 cm de largo, 1.5 a 2 cm de ancho y 1 cm de espesor que varía dependiendo de la estimulación hormonal. Presentan una forma ovoide y de coloración blanca aperlada. La superficie es lisa antes de la pubertad y posteriormente conforme transcurren los ciclos se vuelve rugosa denotando las repetidas ovulaciones. Hay que destacar que estas glándulas no están cubiertas por peritoneo y presentan importantes relaciones anatómicas. El ovario está limitado en su cara posterior por el uréter y la arteria ilíaca interna, en el borde anterior se inserta un repliegue de peritoneo llamado meso-ovario que en realidad es parte del ligamento ancho. El extremo superior comunica con la pared pélvica lateral a través del ligamento infundíbulo-pélvico también conocido como suspensorio del ovario por donde transcurren los vasos y nervios ováricos y por último un vestigio del gubernaculum embrionario denominado ligamento propio del ovario tendido del polo uterino del ovario al cuerno del útero.

Los ovarios están irrigados por las arterias ováricas que se originan de la cara anterior de la aorta abdominal a nivel de L2, después descienden oblicuamente cruzando sobre el uréter a nivel de L3, al entrar a la pelvis pasan sobre los vasos ilíacos externos terminando en el polo tubario del ovario en dos ramas que se anastomosan con las ramas homólogas de las arterias uterinas. Cada vena ovárica se origina en el plexo pampiniforme que es un entretejido de vasos venosos localizado en el ligamento ancho mismos que se anastomosan con el plexo venoso uterino, después acompañan a las arterias ováricas. La vena ovárica izquierda drena en la vena renal ipsilateral mientras que la vena ovárica derecha lo hace directamente en la vena cava.

El drenaje linfático acompaña al de las salpinges para dirigirse hacia los ganglios linfáticos pelvianos y aórticos de la región lumbar.

La inervación esta constituida por los plexos aórtico, renal e hipogástrico superior e inferior que forma los plexos ováricos que corren junto con los vasos ováricos para dar inervación a los ovarios, trompas y ligamento ancho. Las fibras parasimpáticas provienen de los nervios vagos.

## **2.2 Desarrollo Folicular y Ovulación**

Hay que recordar que las células germinales se originan extraembrionariamente en el saco vitelino, hacia finales de la 5ª semana de gestación migran por movimientos ameboides hacia la cresta gonadal, se multiplican activamente y quedan rodeadas por una capa de células que las separan del mesénquima circundante que posteriormente darán origen a las células de la granulosa. Aproximadamente existen 3 a 5 millones de folículos primordiales hacia la semana 25 y en la pubertad este número se reduce a unos 200 a 400 mil. En realidad la mayoría de los folículos primordiales están destinados a la atresia por un mecanismo de apoptosis o muerte celular programada (Hughes y Gorospe 1991)<sup>27</sup>. Gran parte de la dotación de folículos primordiales que iniciaron intrauterinamente la primera división meiótica detenida en la profase permanecerán en esta situación durante 15 años o mas hasta que sean seleccionados en algún ciclo. El folículo primordial debe de pasar por diferentes etapas hasta llegar a convertirse en un folículo maduro De Graff que conlleva la reducción del número diploide de cromosomas a un número haploide.

Hasta los estadios de folículo antral temprano el estímulo para el crecimiento folicular es independiente de gonadotropinas y es asociado a factores intrínsecos celulares, sin embargo ningún folículo podrá alcanzar la madurez sin éste soporte hormonal.

El reclutamiento folicular podría estar estrechamente relacionado con las elevaciones de FSH al final de cada ciclo menstrual. Por otro lado existen factores celulares intrínsecos para que únicamente uno de los folículos llegue a la madurez siendo denominado folículo dominante. Este sistema de selección esta



genéticamente determinado y a pesar del estímulo de FSH para realizar el reclutamiento en ambos ovarios sólo uno de ellos tiene la información adecuada para seleccionar un folículo dominante.

Existe una elevación de LH justo a la mitad del ciclo menstrual que es el indicador fisiológico más fidedigno de la ovulación. Este proceso se puede observar mediante ecografía transvaginal midiendo el folículo dominante que será en promedio de 19.5 mm con límites entre 18 a 25 mm con un volumen folicular máximo de 3.8 ml mismo que puede variar con cada ciclo o en diferentes mujeres. Se acompaña de cambios estructurales a nivel de la pared del folículo que son los siguientes:

1.- El epitelio ovárico está constituido por una capa de células cuboides y múltiples gránulos en el citoplasma que contienen enzimas proteolíticas que ayudan a degradar la pared folicular dando paso a la ovulación, reanudación de la meiosis I, transición de la etapa de profase I a metafase I y expulsión del primer cuerpo polar.

2.- La teca interna tiene la característica de ser el sitio principal de síntesis de esteroides al final de la maduración folicular.

3.- El estrato de la granulosa se adelgaza en el sitio de ruptura folicular y tiene menor capacidad esteroidogénica, por lo que emplean los andrógenos secretados por las células de la teca para producir estrógenos, participando con la formación de líquido folicular.

Los últimos estudios en relación al proceso de la ovulación indican que ocurre 36 a 38 horas posterior al pico de LH.

No se conoce con exactitud cuáles son los cambios estructurales que dan paso a la ovulación, sin embargo pensamos que la disolución enzimática de la matriz extracelular juega un papel preponderante. Además estos cambios son acompañados de aumento en la permeabilidad vascular y liberación de componentes como histamina, bradicinina y prostaglandinas que participan activamente en este proceso.

### 2.3 Endocrinología ovárica

Para poder hablar de los diferentes factores que se encuentra involucrados en los procesos endocrinológicos, hay que mencionar como uno de los principales participantes a las células de la granulosa ya que es, en estas células únicamente donde se expresan receptores para FSH. Si vemos estos cambios como un proceso de maduración, a medida que aumenta el número de células de la granulosa se forman pequeñas uniones entre estas células y el oocito que facilita el intercambio de nutrientes y moléculas reguladoras. Además en el folículo dominante se produce un aumento paralelo de la producción de estrógenos. Este incremento de estradiol produce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH por la hipófisis, que detiene el desarrollo de los demás folículos, ocasionando su atresia.

Al proliferar las células de la granulosa del folículo dominante aparecen receptores para LH, al unirse se detiene la producción de células de la granulosa e inician la producción de progesterona

El ovario produce aproximadamente 500 mg diarios de estradiol cada 24 horas unos días previos a la ovulación y el 80% corresponden al folículo dominante, estos niveles en aumento junto con elevaciones pequeñas pero significativas de progesterona son la señal para el eje hipotalámico-hipofisiario de que el folículo esta preparado para ovular. El estímulo para la secreción de LH parece ser cuando los niveles de estradiol son de 200 pg/ml durante 48 horas.

Se han realizado múltiples estudios para valorar los componentes del líquido folicular con diferentes propósitos y se ha demostrado que la concentración de las diferentes sustancias como oxido nítrico, inhibinas, aromatasa etc, varia dependiendo de la madurez folicular y pueden servir como marcadores de hipoxia durante el desarrollo del ovocito y del embrión in vitro (Barroso y col., 1999)<sup>26</sup> **Cuadro 1**

**Cuadro 1**

Productos que se encuentran en el líquido folicular relacionados con el desarrollo de los ovocitos.

Enzimas	Factor de crecimiento vascular endotelial Aromatasa	Plasminógeno Enzimas de biosíntesis esteroidea
Esteroides	Andrógenos Estrógenos Progestinas	
Factores ováricos no esteroideos	Leptinas Inhibinas Factor de maduración de los ovocitos Inhibidor Luteinizante	Estimulador luteinizante Proteína reguladora de los folículos Oxido nítrico
Hormonas de eje Hipotálamo-hipofisiario	Prolactina Vasopresina Oxitocina	Hormona foliculo estimulante Hormona luteinizante

Kably A., Barroso G.

### III. Introducción

La adecuada interrelación entre las vías de activación y los procesos de bio-regulación folicular para la formación de óvulos altamente competentes es uno de los mecanismos básicos en ciclos expuestos a la respuesta endógena/exógena de gonadotropinas. La obtención de embriones de alta competitividad para proveer mejores posibilidades de concepción, se ha convertido en uno de los objetivos principales en los programas de reproducción humana. El fenómeno de concepción humana esta determinado a través de la variación en diversos bio-marcadores de expresión óvulo/embrionaria que permita una mejor selección y posibilidades de implantación mayor en individuos que son sometidos a este tipo de tecnología de alta complejidad<sup>1</sup>. La foliculogénesis ovárica esta determinada por cambios endócrino-parácrino, que requieren de la interacción dinámica entre la maduración ovular, la suplementación por parte de las células de la granulosa, y la presencia de diversos factores dentro del líquido intrafolicular. El inicio del crecimiento folicular involucra cambios tanto fisiológicos, genéticos como metabólicos para complementar en forma adecuada el proceso de meiosis, la prevención de polispermia, y el proceso inicial de embriogénesis después de la fertilización.

Tanto la adecuada calidad como la adecuada cantidad folicular son necesarias en los procesos de fertilización In-vitro. El número de folículos en desarrollo que ha sido reclutado depende en forma proporcional e inherente a la reserva ovárica, relacionada no solo a la edad cronológica de la paciente, sino también, de la concentración basal de FSH (hormona foliculo estimulante), LH (hormona luteinizante), E<sub>2</sub> (estradiol) e inhibina-B séricos, así como, las características morfométricas de volumen ovárico. La calidad ovárica por otro lado, es una consecuencia directa de los procesos metabólicos y sincronización cromosómica que permitan un estado de fertilización adecuada, y por otro lado la expresión génica, en el desarrollo embrionario en forma temprana así como su diferenciación. Cada uno de estos procesos se encuentra relacionado estrechamente a los fenómenos de atresia e inhibición en los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis.

Cada embrión posee un potencial único de desarrollo, y solo una pequeña y relativa proporción de ellos en el momento de la división celular, es competente para la implantación después del proceso de fertilización en condiciones in-vitro, y su desarrollo a través de la gestación<sup>2,3</sup>. Defectos letales en el

desarrollo ocurren en el gameto femenino antes de la inseminación. Es del conocimiento que los óvulos maduros pueden contener alteraciones cromosómicas de tipo numérico (aneuploidismo), y defectos estructurales a nivel citoplasmático que predisponen de cierta manera la fertilización ovular y su subsiguiente falla en el desarrollo embrionario<sup>3,4</sup>. El potencial de implantación embrionaria puede ser correlacionado con el grado y etapa de división, sin embargo, el valor predictivo en forma general es relativamente bajo. El grado de fragmentación embrionaria u otros defectos morfológicos, así como, el retardo en el desarrollo pueden indicar en forma indirecta una incidencia mayor de anomalías cromosómicas<sup>5</sup>.

Todas estas anomalías pueden ser el resultado de alteraciones de las condiciones intrafoliculares durante la maduración ovular preovulatoria durante la hiperestimulación ovárica controlada. La extensión por la cual la detección de aneuploidismo en óvulos maduros es debida a defectos cromosómicos que se llevan a cabo antes de la supresión en el proceso final de meiosis en estadios de maduración en profase I permanece desconocido<sup>6</sup>. Claramente sabemos que condiciones no óptimas en los medios de cultivo, incluyendo medios de cultivo de baja calidad, pueden generar o ser aditivos para los defectos preexistentes. Se ha tratado de demostrar la presencia de ciertos factores a nivel intrafolicular que son secretados a la circulación general y que pudieran ser predictivos del desarrollo y la competencia óvulo-embrionaria.

### **3.1 Factores de Contrarregulación Homeostática a Nivel Folicular**

Los sistemas reguladores a nivel intrafolicular están compuestos por una serie de sustancias, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, neuropéptidos y moléculas vasorreguladoras. La homeostasis folicular permite el desarrollo de óvulos sanos, fertilizables con una adecuada luteinización, lo cual dependerá en forma estricta, de la relación entre los componentes de flujo vascular y la presencia de moléculas reguladoras.

Numerosos análisis bioquímicos dentro del líquido folicular humano en ciclos estimulados, han demostrado que los niveles de esteroides, hormonas gonadotrópicas, factores de crecimiento, enzimas, etc., difieren en forma significativa entre folículos en el momento en el cual son aspirados durante la captura ovular. La frecuencia de apoptosis en las células de la granulosa y los patrones de adhesión en



las células del cúmulus con la consiguiente proliferación *in vitro* son actividades que sugieren ser folículo-específicos y que se relacionan con la competencia en el desarrollo ovular y embrionario respectivamente<sup>7,8</sup>.

Existen diversos cambios en la microvasculatura perifolicular con liberación de diferentes sustancias como histamina, bradicinina y prostaglandinas. La síntesis de óxido nítrico (NO) es favorecida por liberación de interleucinas principalmente IL-1B incrementando el aporte sanguíneo hacia el folículo dominante. Se ha observado que al inhibir la liberación de NO se suprime la ovulación.

Estudios referentes a la vascularidad perifolicular relacionados con la disolución del contenido de oxígeno intrafolicular sugieren la asociación entre las condiciones intrafoliculares *per se* y la competencia ovular. La valoración clínica en fertilización in-vitro, utilizando la monitorización ovárica en ciclos estimulados con la aplicación de tecnología ultrasonográfica, provee imágenes estáticas en donde el diámetro folicular y los volúmenes aproximados del líquido folicular pueden ser medidos. Esto, en conjunto con las concentraciones séricas de estradiol, apreciación de los diámetros foliculares son utilizados para determinar el tiempo en el cual se debe inducir la ovulación.

La aparente extensión del flujo vascular perifolicular ha sido relacionada con el desarrollo ovular, a través de los embriones obtenidos en forma específica por cada folículo analizado<sup>3</sup>. Análisis citogenético en óvulos en estadio de metafase II han mostrado diferencias en la frecuencia de aneuploidismo si los oocitos fueron obtenidos adecuadamente (<5%) o no (>35%) de folículos vascularizados<sup>3</sup>. El valor clínico en este tipo de estudios ultrasonográficos debe ser verificado con las tasas de embarazo subsecuentes. Lo que es un hecho es que los óvulos que presentan una organización anormal citoplasmática, inclusiones atípicas, desordenes cromosómicos de tipo numérico, así como, la supresión en el desarrollo embrionario, parecen ser predominantes cuando estos derivan de folículos pobremente vascularizados<sup>3</sup>.

### **3.2 Componentes intrafolículos: expresión folículo-específico relacionado con la vascularidad perifolículo.**

Estudios recientes relacionados a la disolución del oxígeno y la composición de factores de crecimiento sugieren una relación directa en la competencia ovular. La medición en el contenido de oxígeno disuelto fue realizada en mas de 1000 folículos aspirados, donde el grado de vascularidad perifolículo fue medido utilizando ultrasonografía Doppler en el día de la ovulación<sup>6</sup>. Los resultados indicaron que la concentración de oxígeno disuelto en el líquido folículo se encontraba entre 1% y 5%. En condiciones de hipoxia severa las concentraciones fueron de <1.5% comparado con >3.5% en folículos bien vascularizados.

La expansión en la vascularidad perifolículo parece estar relacionada con la producción de factores de crecimiento por parte de las células de la teca y la granulosa. El factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE), es un potente factor angiogénico que responde a la presencia de FSH, LH y hCG así como a condiciones establecidas de hipoxia. Aunque, se han señalado concentraciones significativas de este factor en el líquido folículo, su papel continúa siendo controversial. Se ha observado que el desarrollo pobre de la capilaridad perifolículo en mujeres de edad avanzada puede estar relacionado a una expresión disminuida del FCVE así como a otros factores asociados. La observación de que las concentraciones de FCVE en el líquido folículo de mujeres de edad avanzada (con folículos que tienden a ser menos vascularizados) es significativamente mayor cuando se comparan con aquellos que poseen un desarrollo folículo completo y un patrón de vascularidad mejor observado en mujeres jóvenes, lo cuál puede parecer paradójico.

Otros factores que pueden modular la expresión folículo de FCVE, son expresados a nivel de las células de la granulosa para la función de esteroidogénesis<sup>9</sup> y pueden tener una expresión disminuida en mujeres de edad avanzada.

Actualmente se ha descrito a la leptina como promotora en la angiogénesis<sup>10</sup>, y en un reporte reciente, se encontró ser tan efectiva como el FCVE en el proceso de angiogénesis en condiciones *in-vitro*. La leptina y sus receptores son expresados en las células de la granulosa (muy probablemente a nivel del cúmulus), donde parece tener un significado en la producción de esta proteína<sup>11</sup>. Así como en el caso del



FVCE, la producción de leptina se ve asociado a la biosíntesis de esteroides y en el surgimiento de la LH<sup>12</sup>.

En un estudio multicéntrico y longitudinal, tratamos de examinar la relación que existía entre la presencia del FVCE, óxido nítrico y niveles de leptina, con el flujo vascular endotelial, los índices metabólicos y el desarrollo óvulo/embrionario subsecuente, se encontró que todos y cada uno de ellos pueden ser marcadores de hipoxia folicular y desarrollo no-óptimo embrionario, donde las fluctuaciones micro-ambientales en cada uno de ellos, se refleja en el desarrollo ovular.

El entendimiento completo en la relación entre la competencia ovular, vascularidad folicular, y los niveles en los factores angiogénicos no se ha determinado con precisión. Sin embargo, los hallazgos actuales demuestran que potentes factores de crecimiento vascular están presentes en el líquido folicular, dando soporte a la noción que el desarrollo vascular en los folículos preovulatorios pudiera tener un papel importante en la determinación de las condiciones ambientales “normales” a la cuales el ovocito esta expuesto.

### **3.3 Mecanismo Bio-enzimático de Metaloproteinasas de Matriz (MMPs)**

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) pertenecen a una familia de enzimas responsables de la degradación de componentes de matriz extracelular y se pueden dividir en 4 grupos principales como son; estromelinas, colagenasas, gelatinasas y metaloproteinasas. En especial atención a las estromelinas parece ser que usan como sustratos naturales los proteoglicanos, fibronectina y laminina. La estromelina-1 generalmente no se expresa aunque puede ser inducida por factores de crecimiento y citocinas como IL-1<sup>13, 14</sup>. La actividad de las metaloproteinasas de matriz y de aquí, el efecto de remodelación es controlado sobre tres niveles: a) Producción y secreción de enzimas de tipo latente, b) activación de enzimas latentes, y c) inhibición de la actividad enzimática por medio de inhibidores de MMPs<sup>15</sup>.

La síntesis y secreción de colagenasa-1 y estromelina-1 son estimulados por IL-1 y FNT

Los inhibidores relacionados a MMPs pueden ser clasificados como: a) derivados titulares de soporte sérico e b) inhibidores de la actividad enzimática para MMPs (TIMPs). Los inhibidores de soporte sérico, como la  $\alpha_2$ -macroglobulina se encuentra localizada en diversos niveles del organismo humano. El papel principal de esta clase de inhibidores en la regulación de la actividad de MMPs a nivel tisular a sido cuestionada, básicamente por sus dimensiones (>720 kDa) y su capacidad para cruzar la membrana basal endotelial. La segunda clase de inhibidores de MMPs conocidos como inhibidores titulares de metaloproteinasas (TIMPs), los cuales son secretados a nivel tisular y, son postulados para el control en el sitio y extensión de remodelación tisular por inducción-MMP. Actualmente son cuatro los TIMPs relacionados a los procesos de angiogénesis, esteroidogénesis, proliferación celular y desarrollo glandular mamario (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4) <sup>16</sup>. De los mecanismo moleculares propuestos para activar o inhibir a las MMPs y TIMP es a través de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como el NO y el anión superóxido<sup>17</sup>.

### **3.4 Relación de la actividad de Metaloproteinasas de Matriz en los procesos Reproductivos**

Durante el curso del ciclo reproductivo se ha tratado de relacionar el efecto tanto de la expresión de metaloproteinasas como de los inhibidores enzimáticos directamente a los procesos de expresión endometrial, desarrollo folicular, expresión esteroidogénica, complejo cúmulo-ovular, etc. La expresión de los inhibidores de metaloproteinasas dentro del útero, y su papel específico permanece aún desconocido prácticamente en todas las especies animales. Previamente, se ha demostrado que la disrupción génica para la producción de TIMP-1 resulta en la alteración de los ciclos reproductivos en un fenotipo útero-aberrante. Estas características fenotípicas pueden estar dadas por el incremento en la actividad de metaloproteinasas de matriz *in-útero*. De esta manera, un incremento en la actividad y concentración de proteasas ha sido descrita en forma secundaria a la disrupción en la expresión de TIMP-1.<sup>18</sup>

El estudio en la relación del potencial colangeolítico y la transcripción-RNAm en los componentes de degradación de matriz extracelular han sido expuestos en modelos bovinos de estudio. La expresión de diversos factores [factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor beta 1 de crecimiento de

transformación (TGF- $\beta$ 1)], han sido cuantificados en el complejo cúmulo-ovular (COC) en condiciones de maduración *in-vitro*. Estos estudios han sugerido un incremento en los procesos de proteólisis extracelular en condiciones de maduración *in-vitro* en los complejos COC en bovinos, relacionados directamente a este tipo de factores de crecimiento <sup>19</sup>.

La fragmentación y disociación de la matriz del tejido conectivo, y de las fibras de colágena en la túnica albugínea y la teca externa previas a la ruptura folicular, se han correlacionado con un aumento en la actividad de proteasas presentes en el líquido folicular<sup>20</sup>.

Se han estudiado otro tipo de sistemas que igual participan conjuntamente en el proceso de la ovulación como es el de plasminógeno/plasmina. El activador del plasminógeno está integrado por dos activadores, el de tipo tisular y urocinasa ambos han sido aislados en folículos humanos pero únicamente se encontró una correlación positiva con el de tipo tisular. La importancia radica en que posterior a la elevación de LH y FSH existe un aumento preovulatorio del sistema activador de plasminógeno de tipo tisular y supresión de sus inhibidores a nivel de las células de la granulosa, a su vez activa a la plasmina actuando sobre las colagenasas que son principalmente metaloproteasas, mismas que alteran la integridad estructural de la pared folicular facilitando la ruptura durante la ovulación.

Pocos son los estudios relacionados a los eventos de maduración y remodelación ovular. Sin embargo, la expresión proteolítica de metaloproteinasas de matriz (MMO-1, MMP-3), han sido sugeridos en los eventos de remodelación a través del ciclo ovárico. Con la aplicación de ensayos de inmunoadsorbencia (ELISA) se ha podido demostrar una disminución en la actividad de MMP-1 dentro de la región apical de la pared de folículos atrésicos. De la misma manera una correlación negativa fue encontrada entre la concentración de MMP-3 y el diámetro folicular <sup>21</sup>. Estos datos han sugerido un papel preponderante en la actividad de MMPs en la fase final de los procesos de atresia.

#### **IV. Planteamiento del Problema**

La participación de diversos componentes bio-moleculares han servido como marcadores de desarrollo folicular , tanto en ciclos naturales como en aquellos sometidos a estimulación ovárica controlada. Las metaloproteinasas y sus inhibidores juegan un papel esencial en la regulación de degradación de la pared folicular en el periodo periovulatorio, sin embargo hasta nuestros días no se conoce con precisión la importancia del complejo de inhibición enzimática de metaloproteinasas (TIMP-1) durante ciclos estimulados con gonadotropinas y su relación con el desarrollo óvulo embrionario.

## **V. Justificación**

Actualmente sabemos la relación que existe entre las metaloproteinasas y sus inhibidores en la pared folicular y la función de degradación que tienen a éste nivel, sin embargo no existen estudios que correlacionen las concentraciones séricas y en líquido folicular de pacientes que fueron sometidas a la administración exógena de hormona folículo estimulante recombinante humana para valorar la capacidad generativa folículo/embrionaria y el papel que juega en los procesos de atresia.

## **VI. Objetivo**

El objetivo del presente trabajo es demostrar el impacto en la expresión del complejo de inhibición enzimática de metaloproteinasas (TIMP-1) y la concentración de metaloproteinasas de matriz [MMP-3/(estromelisin)] en los procesos de foliculogénesis y el subsecuente desarrollo óvulo/embrionario bajo la administración exógena de gonadotropinas recombinantes. Los datos que a continuación se describen son una base preliminar en un proyecto de diseño longitudinal y prospectivo.

## **VII. Hipótesis**

Las pacientes que son sometidas a ciclos de reproducción asistida bajo la administración de hormona folículo estimulante recombinante humana contienen en el líquido folicular concentraciones del complejo de inhibición enzimática de metaloproteinasas (TIMP-1) que se correlacionan con la calidad folículo embrionaria y con los procesos de atresia.



## VIII. Material y Métodos

### 8.1 Selección y evaluación en ciclos de hiperestimulación controlada

Un total de 20 pacientes fueron incluidas en forma prospectiva dentro de un estudio de tipo longitudinal realizado entre Enero y Marzo del 2003. Los rangos de edad se encontraron entre 23 y 41 años con una media de  $33.9 \pm 5.0$ . Pacientes con indicación para procedimiento de fertilización In-Vitro así como, técnicas de micromanipulación como la inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) fueron incluidas dentro del protocolo de estudio. En el caso de factor masculino se realizaron pruebas de capacitación espermática con técnica de swim-up y aplicación del criterio estricto de Tygenberg<sup>22</sup> para la aplicación de cada una de las técnicas de alta complejidad

Aquellas pacientes con una FSH  $\geq 15$  mUI/ml por estudio de quimioluminiscencia (predictivo de pobre respuesta ovárica) fueron excluidas del análisis. En adición, pacientes con una relación LH/FSH de 0.85:1 o mayor [ovario poliquístico (*PCO*)] y aquellas que cursaran con un hipogonadismo hipogonadotrópico fueron también eliminadas.

Todos las pacientes fueron suprimidas con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (aGnRH) (Lucrin®: Laboratorios de México, Ciudad de México), utilizando el protocolo de fase lútea media. La GnRH fue iniciada en la fase lútea media previo al ciclo estimulado a una dosis de 0.5 mg/día y reduciendo a 0.25 mg/día al iniciar el primer día del ciclo menstrual el cual se continuaría hasta la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) –protocolo largo de aGnRH-. FSH recombinante (Gonal-F®: Laboratorios Serono de México, Ciudad de México), se administró el día tres del ciclo menstrual con dos ampulas (150 UI/ampula), en donde la dosis sería ajustada en forma individual utilizando el protocolo de step-down. Cuando se observaron un mínimo de tres folículos  $\geq 18$  mm a través del ultrasonido, 250 mcg s.c. de hCG fueron administradas. Los ciclos fueron cancelados cuando menos de tres folículos se reclutaron al día 9 del ciclo o si el pico de estradiol se incrementaba

en forma inapropiada. La aspiración folicular se llevo a cabo 34 a 36 horas posteriores a la administración de hCG.

Cada uno de los ovarios fue medido en sus ejes axial y longitudinal en tiempo real con un transductor de 6.5 MHz (General Electric, Logic® 200, Tv)

Únicamente se analizó el resultado de ovocitos preovulatorios maduros (metafase I y II durante el tiempo de aspiración). Se evaluaron los ovocitos obtenidos en forma independiente obtenidos a través de la aspiración ovular para correlacionarlos directamente con su desarrollo posterior embrionario y las concentraciones de TIMP-1/MMP-3.

El proceso de inseminación dentro del laboratorio se llevó a cabo dependiendo de la indicación establecida por cada caso (estándar o a través de fertilización asistida con inyección intracitoplasmática de esperma ó ICSI).

El desarrollo embrionario se llevó a cabo utilizando medios de cultivo (P1) hasta obtener de 6 a 8 células previo a la transferencia embrionaria. Un promedio de tres a cuatro embriones fueron transferidos a la cavidad uterina dependiendo de la calidad embrionaria y edad de la paciente. Todas las pacientes recibieron suplemento de fase lútea con progesterona intravaginal 600 mg. diariamente.

## **8.2 Ensayo para determinación de Metaloproteinasas MMP-3/TIMP-1**

La determinación de MMP-3/TIMP-1 fue medida con la utilización de inmunoensayos enzimáticos (ELISA) con la aplicación de anticuerpos monoclonales. Posterior a la recolección de las muestras (tanto séricas como de líquido folicular) están fueron centrifugadas a 400 g x 15 min. y conservadas en refrigeración a -20° C.

Para la evaluación del ensayo se tomaron 100 µL de la muestra los cuales fueron colocados dentro de cada uno de los pozos para su evaluación. A cada uno de los pozos se les colocó una lámina y fueron cubiertos para su incubación a temperatura ambiente por las siguientes dos horas sin que estas fueran agitadas. Las muestras fueron tomadas y lavadas en cuatro ocasiones con solución Buffer IX procurando

mantener a su límite cada uno de los pozos. Cada uno de los pozos fue lavado utilizando 400  $\mu\text{L}$  de solución Buffer IX utilizando pipetas multicanal. La solución Buffer fue removida completamente después de ser utilizada.

100  $\mu\text{L}$  del conjugado MMP-3 fue colocado en cada uno de los pozos, los cuales fueron cubiertos con una membrana laminar y sellados para ser mantenidos a temperatura ambiente por una hora. Posterior a la incubación el reagente fue aspirado y lavado en cuatro ocasiones con la misma solución Buffer. 100  $\mu\text{L}$  de tetrametilbenzidine (TMB) fue colocado nuevamente el cual fue cerrado e incubado por 30 min. a temperatura ambiente a la oscuridad.

Posterior a esto se agregó 100  $\mu\text{L}$  de la solución de detención (2.5 N de ácido sulfúrico) dentro de cada pozo en el mismo orden como fue agregado previamente el TMB. Medidas de absorbancia fueron obtenidas bajo lecturas espectrofotométricas con bivalencia de lecturas 450/595 nm.

## IX. Evaluación Estadística

Por el tipo de distribución Gaussiana pruebas de distribución paramétrica tipo Welch fueron utilizadas. Intervalos de confianza al 95% fueron expresados por cada uno de los grupos de estudio. Pruebas de significancia aplicando el método de Kolmogorov-Smirnov fueron utilizados para evaluar diferencias entre cada uno de los grupos basado en la discrepancia entre la distribución de la población (en este caso heterogénea) y el número de datos incluidos dentro del estudio. Por diseño de estudio se realizó una evaluación en la tasa de crecimiento relacionado a la determinación de TIMPs/MMPs en diversos tiempos de evaluación.

Modelos de regresión lineal fueron aplicados para la obtención de coeficientes de correlación ( $r$ /  $r^2$ ) entre grupos de estudio, grados de libertad y suma de cuadrados fueron determinados de la misma manera. Todos los valores obtenidos fueron expresados como media, desviación estándar, así como, error estándar, expresando significancia con  $p < 0.05$ .

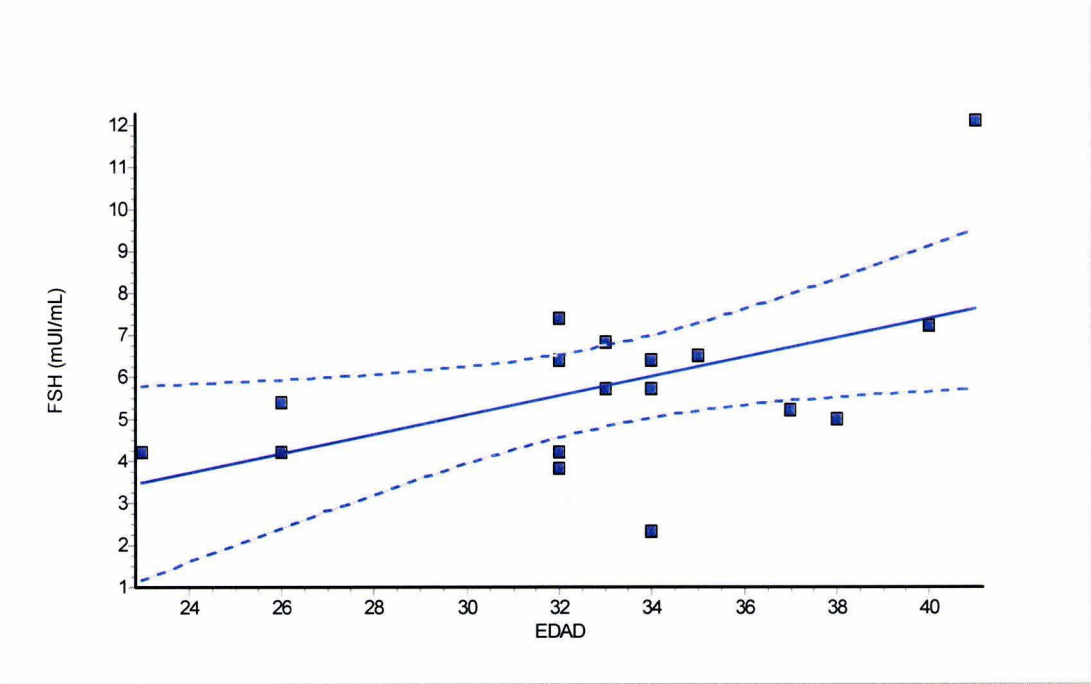
## X. Resultados

La edad promedio de las pacientes fue de  $33.9 \pm 5.0$  años con un rango entre 23 y 41 años de edad. La estatura y talla fueron correlacionados directamente con el índice de masa corporal (IMC) con una media de  $23.4 \pm 3.19$ , lo que implica que la mayoría de los sujetos de estudio eran pacientes no-obesas, lo cuál podría tener alguna implicación en la cantidad de FSH recombinante administrada. La evaluación por diseño de estudio de la reserva ovárica fue similar para cada uno de los casos lo cual se muestra en la *tabla 1*.

<b>Tabla 1. Características demográficas y de reserva folicular en el grupo de estudio</b>	
<b>Variable</b>	<b>Valor de incidencia</b>
Edad	$33.90 \pm 5.00$
Peso	$61.95 \pm 7.90$
Talla	$1.63 \pm 0.10$
IMC	$23.4 \pm 3.19$
FSH/D31 (mUI/mL)	$5.79 \pm 2.11$
LH/D31 (mUI/mL)	$4.38 \pm 2.00$
E2 /D31 (pg/mL)	$43.08 \pm 22.40$
1D3: Basales séricos en día tres del ciclo estimulado	

Por modelos de regresión lineal se encontró una correlación positiva entre las basales en día 3 de FSH y la edad de la paciente [(r<sup>2</sup>= 0.26) (p= 0.03)] **Figura 1.**

**Fig 1. Efecto de regresión entre la capacidad de función ovárica y edad**





La dosis promedio de medicamento relativamente bajo muy probablemente relacionado a las características demográficas de la población en estudio. La tasa promedio de óvulos maduros en metafase II (M2) fue de  $10.78 \pm 6.8$  óvulos, el número de óvulos fertilizados en dos pronúcleos fue de  $5.21 \pm 3.1$ , transfiriéndose un promedio de  $3.21 \pm 1.0$  embriones *Tabla 2*.

**Tabla 2. Desarrollo foliculo/embrionario en la población general de estudio**

<b>Variable</b>	<b>Valor de incidencia</b>
No. Ampolletas	$17.29 \pm 5.23$
Pico de estradiol (pg/mL)	$3011 \pm 1653$
Día de hCG	$11.72 \pm 0.89$
No. Óvulos en Metafase II (M2)	$10.78 \pm 6.81$
No. Óvulos en Metafase I (M1)	$1.67 \pm 1.64$
No. Óvulos en Profase I (P1)	$1.28 \pm 1.52$
No. Óvulos fertilizados (2PN)	$5.21 \pm 3.15$
No. Embriones transferidos	$3.21 \pm 1.03$
Tasa embarazo clínico/trasferencia	50 %



De acuerdo a la respuesta folicular los grupos fueron separados de acuerdo a la edad, el grupo I (<35 años) y grupo II (>35 años) en los cuales las características de distribución presentaron una media de  $1.21 \pm 1.30$  para el primer grupo y  $0.12 \pm 0.12$  para el segundo según se muestra en la *tabla 3*.

**Tabla 3. Distribución Gaussiana por grupos en el complejo del factor de inhibición/ Estromelisina-1**

Parámetro	TIMP-I/MMP-3 (<35 años)	TIMP-I/MMP-3 (>35 años)
Media	1.21	0.12
Desviación estándar	1.30	0.12
Error estándar	0.39	0.06
1IC 95% Inf.	0.33	-0.07
2IC 95% Sup.	2.08	0.32
1IC 95% Inf. : Intervalo de confianza inferior		
2IC 95% Sup.: Intervalo de confianza superior		

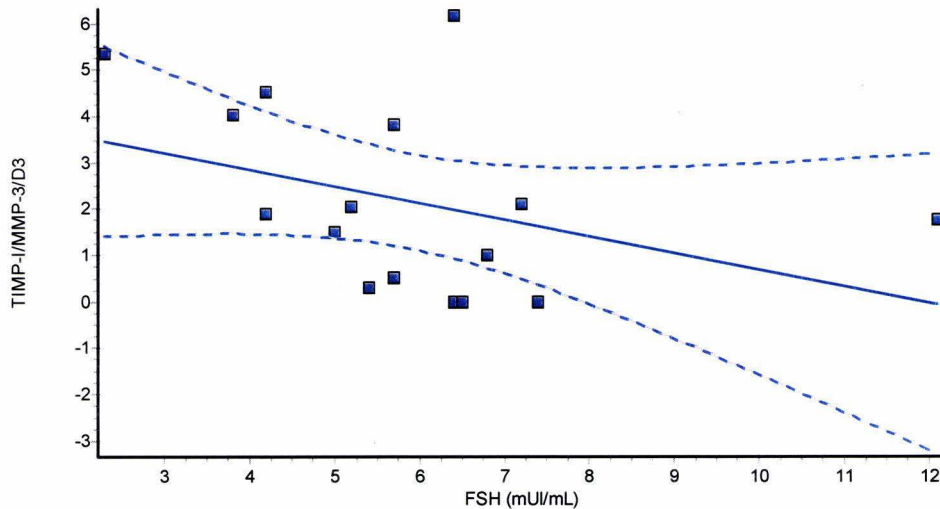
Diferencias significativas fueron encontradas al comparar la concentración del complejo TIMP-1/MMP-3 por grupos de edad en donde las concentraciones fueron mucho mayores en paciente por debajo de los 35 años comparado con su grupo alterno ( $p=0.05$ ) como se muestra en la **tabla 4**.

**Tabla 4. Evaluación diferencial en la concentración del complejo de metaloproteinasas por homogeneidad de grupos**

Parámetro	TIMP-I/MMP-3 (<35 años)	TIMP-I/MMP-3 (>35 años)	p
Día 3/1Ce (ng/mL)	2.55 ± 2.34	1.36 ± 0.81	0.05
Día 12 / 1Ce (ng/mL)	1.26 ± 1.42	0.23 ± 0.19	0.05
2[Lf] (ng/mL)	0.83 ± 0.86	0.43 ± 0.40	0.05
Ce : Ciclo estimulado			
2[Lf] : Concentración en líquido folicular			

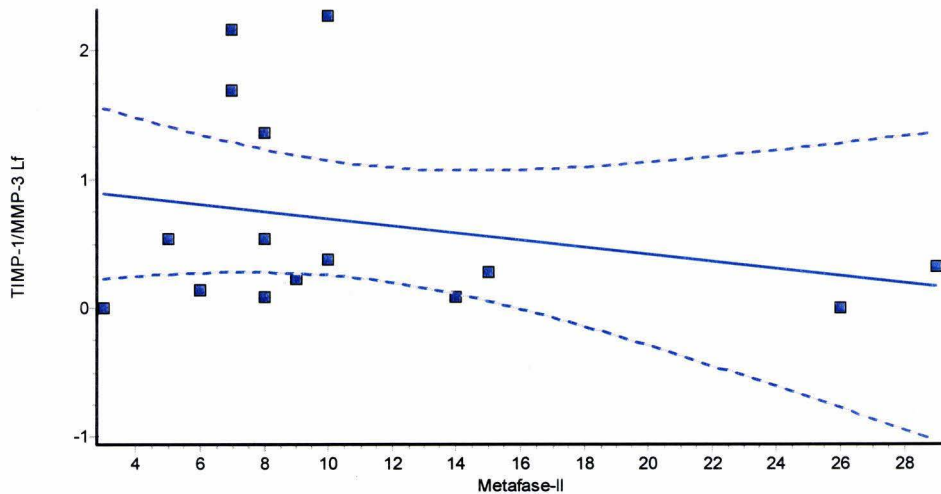
Se correlacionó aunque no significativamente la concentración de metaloproteinasas y las básicas de reserva folicular evaluada a partir de la concentración sérica de FSH en día tres del ciclo no-estimulado ( $r^2= 0.14$ ) *Figura 2*.

**Fig 2. Relación lineal de la concentración del complejo de metaloproteinasas con la concentración basal de FSH.**



Del mismo modo, la obtención de óvulos maduros en estadio de metafase II se correlacionó negativamente con la concentración basal del complejo de metaloproteinasas valorado en el tercer día de la estimulación ( $r^2= 0.67$ ) **Figura 3.**

**Fig 3. Correlación entre la concentración de metaloproteinasas en liquido folicular y calidad ovular**



## XI. Discusión

Existe evidencia en relación a los procesos regulados a partir de la concentración de moléculas de soporte y degradación por parte de las metaloproteinasas y sus complejos de inhibición, no solo en el área reproductiva sino también, en diversos procesos fisiopatológicos dentro del organismo humano. Durante los procesos de ovulación la matriz extracelular es degradada dentro del ápex folicular, facilitando la liberación del ovocito<sup>23</sup>. El líquido folicular intrafolicular contiene al menos dos tipos de inhibidores de proteinasas cuya actividad esta correlacionada directamente con la actividad dentro del ambiente hormonal. Durante la fase periovulatoria y posterior al surgimiento de LH, el incremento de los fenómenos de esteroidogénesis se ve incrementado<sup>24</sup>. El surgimiento del pico de LH o la administración de hCG incrementan del mismo modo la actividad de colágeno/metaloproteinasas, enzima que ha sido propuesta en la degradación apical de tejido conectivo de matriz<sup>25</sup>. A pesar de la estimulación en la actividad de la colagenasa por parte de la LH esta bien documentada, el control subsecuente de la colagenólisis folicular permanece desconocido. Por otro lado, se ha observado un incremento en los inhibidores relacionados directamente tanto con la concentración de estradiol como de progesterona en los estadios de maduración folicular.

El presente estudio ha señalado la relación en la concentración del complejo de inhibición TIMP-1/MMP-3 en ciclos de estimulación ovárica controlada expuestos a la administración exógena de gonadotropinas recombinantes. Los hallazgos iniciales muestran una disminución en las concentraciones a través del ciclo estimulado, en donde pueda estar directamente relacionado a las condiciones microambientales foliculares. Ha sido demostrado con anterioridad una disminución en las concentraciones de MMP-1 en folículos atrésicos, lo cual observa una correlación con los hallazgos encontrados en el presente estudio. Por otro lado, existe una correlación negativa entre la cantidad de MMP-3 y el diámetro folicular<sup>21</sup>.

A pesar de haber observado diferencias ligeramente significativas en la población (muy probablemente por la heterogeneidad y un número limitados de datos para su evaluación) en cuanto a las concentraciones de los complejos TIMP-1/MMP-3 se hace evidente una disminución paulatina de estos a lo largo de ciclo menstrual. Por otro lado, cuando comparamos dos poblaciones diferentes por grupo de edad encontramos diferencias sumamente significativas en donde pacientes menores de 35 años

mantienen niveles séricos de metaloproteinasas mayores que aquellas con una edad superior a esta. El valor predictivo de estos resultados pueden eventualmente mostrar una correlación de la calidad ovular asociado a los procesos de atresia folicular y una interrelación con los procesos de muerte celular programada.

Bajo esta misma conformación de datos observamos que la edad presenta un efecto irreversible en los procesos de estimulación, no solo, en la cuantificación folicular obtenida a través del ciclo estimulado sino probablemente, con la calidad ovocitaria relacionada a estos factores intrafoliculares. Uno de los objetivos establecidos durante el diseño de estudio fue el de evaluar la tasa de crecimiento en la concentración de TIMP-1/MMP-3 y relacionarlo directamente con la edad a través de ciclo estimulado. Dentro de los hallazgos más importante fue el observar que la concentración de metaloproteinasas disminuye en un 14% por cada año que incrementa la edad de la paciente.

Finalmente, la expresión de los complejos antes mencionados y su relación con los eventos de maduración y remodelación folicular nos permitirá explicar ciertos fenómenos relacionados con la dinámica bio-molecular ovocitaria. La expresión de marcadores de respuesta intrafolicular nos permitirá evaluar las condiciones de desarrollo óvulo/embrionario no solo en ciclos naturales sino también en aquellos relacionados a la administración exógena de gonadotropinas dentro de los procesos de tecnología reproductiva



## **XII. Conclusiones**

- 1.- Existen múltiples marcadores tanto séricos como en el líquido folicular que señalan la importancia que brindan en los procesos de calidad folicular, embrionaria y en los procesos de atresia tanto en ciclos naturales como en estimulación ovárica controlada.
- 2.- Aunque sabemos que hay gran cantidad de marcadores a nivel folicular, ninguno de ellos es específico para determinar la calidad y capacidad ovocitaria. Aparentemente es el conjunto de todos estos marcadores el que delimita una mejor respuesta en la pacientes.
- 3.- El presente estudio señala la relación en la concentración del complejo de inhibición de metaloproteinasas TIMP-1/MMP-3 en ciclos de estimulación ovárica controlada expuestos a la administración exógena de gonadotropinas recombinantes. Los hallazgos muestran una disminución en las concentraciones a través del ciclo estimulado, en donde probablemente este directamente relacionado a las condiciones microambientales foliculares.
- 4.- Ha sido demostrado con anterioridad una disminución en las concentraciones de MMP-1 en folículos atrésicos, lo cual observa una correlación con los hallazgos encontrados en el presente estudio.
- 5.- Es necesario realizar mas estudios para determinar la utilidad de los marcadores intrafoliculares, específicamente del complejo de inhibición de metaloproteinasas estudiado. Observamos que las concentraciones del complejo de inhibición de metaloproteinasas [TIMP/(MMP-3/Estromelina-1)] disminuyen significativamente con la edad de la paciente asociándose a folículos de menor calidad.

## **Bibliografia**

1. Gradner, D., Lane, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum. Reprod. Update*, 1997; 3: 367-382.
2. Acosta, A., Oehninger, S., Morshedi, M., Swanson, R., Scott, R., Irianni, F. Implantation potential of each pre-embryo in multiple pregnancies obtained by in vitro fertilization seems to be different. *Fertil. Steril.*, 1988; 50: 906-911.
3. Van Blerkom, J. Can the developmental competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory? *Hum. Reprod.*, 1997; 12: 1610-1614.
4. Van Blerkom, J., Antczak, M. and Schrader, R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum. Reprod.*, 1997; 12: 1047-1055.
5. Kligman, I., Benavide C., Alikani, M., Munne, S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum. Reprod.*, 1996; 11: 1492-1498.
6. Van Blerkom, J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 1998; 15: 226-234.
7. Billing, H., Furuta, I. and Hsueh A. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 1003; 103: 310-313.
8. Seifer, D., Gardiner, A., Ferreira, K. and Peluso, J. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 1996; 66: 593-598.

9. Anastasi, J., Kalantaridou, S., Kimsey, L. et al. Human Follicular Fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Hum. Reprod.*, 1998; 13: 1144-1147.
10. Boulomieu, A., Drexler, H., Lafontan, M. and Busse, R. Leptin, the product of the Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ. Res.*, 1998; 83: 1059-1066.
11. Messinis, I. and Milingos, S. Leptin in human reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 1999; 5: 52-63.
12. Barroso, G., Barrionuevo, M., Rao, P., Graham, L., Danforth, D., Huey, S., Abuhamad, A. And Oehninger, S. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide and leptin follicular fluid levels correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertil. Steril.*, 1999; 72: 1024-1026.
13. Borden, P., and Heller, R. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gen Expression.*, 1997; 7:159
14. Klippel, J., Dieppe, P., *Rheumatology*, Second Edition. Vol 1: 1.8.1-1.8.2
15. Birkedal-Hansen, H., Moore, W., Bodden, M., Windsor, L., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 1993; 4: 197-250.
16. Fridman, R., Bird, R., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Komarek, D., Liang, CM., Berman ML., Liotta, LA., Stetler-Stevenson, WG., Fuerst, Tr. Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J.*, 1993; 289: 411-416.
17. Yonne, YC., Conquer, JA., Grinstein, J. Interleukin-p induction of c-fol and collagenase expression in articular chondrocytos: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem*, 1998; 69: 19-29.

18. Warren, B. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene in reproductive-age female mice is associated with estrous cycle stage-specific increases in stromelysin messenger RNA expression and activity. *Biol Reprod.*, 2001; 65: 1780-1788.
19. Bieser, B., Stojkovic, M., Wolf, E., Meyer, H., Einspanier, R. Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumuocyte complexes. *Biol Reprod.*, 1988; 59: 801-806.
20. Goetz, FW., Bendtson, AK., Ranjan, M. Ovulation: mediators at the ovarian level. In: Pang MG, Scheribman, Jones R. editors. *Vertebrate endocrinology; fundamentals and biomedical implication*. San Diego, CA, USA: Academic Press; 1991; 4: 127-204.
21. Bogusiewicz, M., Rechberger, T., Jakimiuk, AJ., Skorupski, P., jakowicki, JA., Postawski, K. Evaluation of matrix metalloproteinases-1 and -3 concentrations in the tunica albuginea, the apical wall of atretic follicles and the corpus luteum of normal human ovaries. *Gynecol Endocrinol.*, 2000; 14: 25-31.
22. Kruger, TF., Menkveld, R., Stander, FS., Lombard, CJ., Van der Merwe, JP., Van Zyl, JA., Smith, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.*, 1986; 46: 1118-1123.
23. Espey, LL. Ovulation as an inflammatory reaction a hypothesis. *Biol Reprod.*, 1980; 22: 73-106.
24. Leung, P., et al. Interactions of steroids and gonadotropins in the control of steroidogenesis in the ovarian follicle. *Annu Rev Physiol.*, 42:71
25. Curry, T., et al. The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. *Biol Reprod.*, 1985; 33:981.
26. Barroso G., Barrionuevo M., Rao P, et al. Vascular endothelial growth factor, nitric oxide and leptin follicular fluid concentrations correlate negatively with embryo quality in IVF patients. *Fertility and Sterility*, 1999; 72: 1024-1026

27. Hughes F., Gorospe W. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cell: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; ,129: 2415-2422.