



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS EN
LÍQUIDO FOLICULAR:
¿FACTOR PRONÓSTICO EN FECUNDACIÓN IN-VITRO?**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**

**PRESENTA:
CARLA GILLEN BRENES**

TUTORES:

**DR. ÁLVARO SANTIBAÑEZ MORALES
DIRECTOR DE TESIS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DR. SALVADOR ESPINO Y SOSA
ASESOR DE TESIS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

MÉXICO D.F., NOVIEMBRE 2013



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.

TÍTULO DE TESIS:

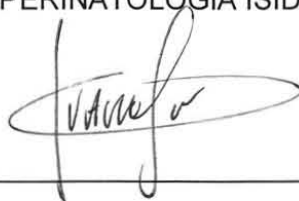
FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS EN LÍQUIDO FOLICULAR: ¿FACTOR PRONÓSTICO EN FECUNDACIÓN IN-VITRO?



DR. RODRIGO AYALA YÁÑEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES



DR. JULIO FRANCISCO DE LA JARA DÍAZ
SUBDIRECTOR DE MEDICINA REPRODUCTIVA Y PROFESOR TITUTLAR DE LA ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA.
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES



DR. ÁLVARO SANTIBAÑEZ MORALES
DIRECTOR DE TESIS
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES



DR. SALVADOR ESPINO Y SOSA
ASESOR METODOLÓGICO DE TESIS
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGIA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES

AGRADECIMIENTOS

A mi papá, por enseñarme a trabajar para alcanzar metas y creer en mí.

A mi mamá por darme todo su apoyo y el ejemplo diario de lo que es una mujer admirable.

A mis hermanos: Andy, Cuco y Pablo por asumir muchas responsabilidades familiares mientras he estado fuera, y apoyarme siempre con su cariño y confianza.

A Carlos, por tenerme tanta paciencia, apoyarme en cada meta y ser el mejor compañero que la vida me pudo dar.

Al Dr.Santibáñez, Dr.Espino y Karina por hacer posible que mi tesis fuera una experiencia de aprendizaje en la investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| ANTECEDENTES..... | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| Hiperestimulación ovárica | 9 |
| Medición de la concentración de G-CSF | 10 |
| Análisis hormonales | 11 |
| Técnicas de fertilización y clasificación ovocitaria /embrionaria | 11 |
| Análisis exploratorio | 12 |
| Análisis estadístico | 12 |
| RESULTADOS | 14 |
| Características Sociodemográficas | 14 |
| Características de la Hiperestimulación Ovárica | 15 |
| Características la Técnica de Fertilización Utilizada..... | 16 |
| Características de los ovocitos obtenidos | 16 |
| Características de los embriones obtenidos..... | 16 |
| DISCUSIÓN..... | 18 |
| CONCLUSIÓN..... | 20 |
| TABLAS Y GRÁFICOS..... | 22 |
| REFERENCIAS | 24 |

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citocina cuyas concentraciones aumentan progresivamente durante la foliculogénesis y se relaciona con el desarrollo embrionario.

OBJETIVO: Evaluar la asociación de la concentración de G-CSF en el líquido folicular (LF) del folículo de mayor tamaño como factor pronóstico en técnicas de reproducción asistida (TRA).

MATERIAL Y MÉTODOS: Se diseñó un estudio de casos y controles en mujeres infértiles que aceptaron participar en el estudio en el periodo de junio a diciembre de 2012 en el Instituto Nacional de Perinatología. Se cuantificó mediante ELISA el G-CSF obtenido del LF del folículo de mayor tamaño en la captura ovocitaria. Se exploró la asociación de las concentraciones de G-CSF con parámetros de éxito reproductivo. Se analizó la correlación entre variables con prueba de Pearson o Spearman.

RESULTADOS: La concentración media de G-CSF en el LF fue de 85.7 ± 7.5 pg/ml. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de G-CSF entre las pacientes que lograron embarazo y las que no (92.3 ± 15.6 vs 81.8 ± 7.7 $p= 0.50$), tampoco en relación a otros parámetros como presencia o ausencia de endometriosis (73.1 ± 14.7 vs 89.4 ± 8.7 respectivamente $p= 0.37$) y embriones Top vs non-Top (55.1 ± 6.4 vs 72.7 ± 7.6 respectivamente, $p= 0.10$).

CONCLUSIÓN: No hubo correlación entre la concentración de G-CSF en el folículo de mayor tamaño durante la captura ovocitaria y los indicadores de éxito reproductivo.

PALABRAS CLAVE: factor estimulante de colonia de granulocitos, líquido folicular, metabolómica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) is a cytokine whose concentrations increase progressively during folliculogenesis and relates to embryonic development.

PURPOSE: To evaluate the association of G-CSF concentration in the follicular fluid (FF) of the largest follicle as a prognostic factor in assisted reproduction techniques (ART).

MATERIAL AND METHODS: We designed a case-control study in infertile women who agreed to participate in the study in the period between June to December 2012 at the National Institute of Perinatology. G-CSF was quantified by ELISA in the FF obtained from the largest follicle in oocyte retrieval. We explored the association of G-CSF concentrations with reproductive success parameters. We analyzed the correlation between the variables with Pearson or Spearman test.

RESULTS: The average concentration of G-CSF in FF was 85.7 ± 7.5 pg/ml. No statistically significant differences were found in G-CSF between patients who achieved pregnancy and those who didn't (92.3 ± 15.6 vs. 81.8 ± 7.7 , $p=0.50$) neither do we find differences in other parameters such as the presence or absence of endometriosis (73.1 ± 14.7 vs. 89.4 ± 8.7 respectively, $p=0.37$) or Top vs. non-Top embryos (55.1 ± 6.4 vs. 72.7 ± 7.6 respectively, $p=0.10$)

CONCLUSION: There was no correlation between the concentration of G-CSF in the largest follicle during oocyte retrieval and reproductive success indicators.

KEYWORDS: Granulocyte colony stimulating factor, follicular fluid, metabolomics.

ANTECEDENTES

El G-CSF es una citocina que estimula la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, principalmente hacia la línea neutrófila.¹ Los monocitos y macrófagos se encuentran entre la principal fuente de G-CSF, pero este factor también puede ser producido por las células de origen mesodérmico.² La producción de G-CSF puede ser inducida in vitro en estas células por una amplia variedad de agentes estimulantes, incluyendo lipopolisacáridos, IL (Interleucina)-1, IL-3, IL-4, interferón, factor de necrosis tumoral y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.ⁱⁱ

El ovario es un sitio de interacción entre el sistema inmune y endócrino, a través de los leucocitos y sus productos de regulación local: las citocinas. La expresión de G-CSF y su receptor en las células de la granulosa sugieren que esta citocina tiene un papel fundamental en la proliferación y desarrollo de estas células y por lo tanto está implicado en la foliculogénesis y ovulación.³

El G-CSF se ha vinculado con éxito reproductivo dado su papel fundamental en la foliculogénesis, ovulación, desarrollo embrionario e implantación.⁴ Se ha observado una correlación entre los niveles de esta citocina y la respuesta ovular pobre, normal y alta.^{5,6}

Investigaciones adonde se añade G-CSF al medio de cultivo embrionario han mostrado mejoría en la progresión embrionaria utilizando la clasificación de calidad de Lucinda Veeck.⁷

Este factor de crecimiento favorece la división celular de las blastómeras en el embrión al inhibir la apoptosis celular y disminuir el porcentaje de fragmentación.⁸

Adicionalmente, el G-CSF ejerce efectos positivos sobre varios procesos genéticos

como: proliferación celular, progresión a blastocisto, eclosión de la zona pelúcida y la implantación del embrión en el endometrio.⁹

Hasta la fecha los estudios disponibles correlacionan la concentración de G-CSF en suero y parámetros de éxito en las técnicas de alta complejidad reproductiva.^{10, vi} El análisis de la morfología embrionaria pre-implantación, aunque importante, no es suficiente para predecir éxito reproductivo.¹¹ Las investigaciones actuales se orientan al análisis metabolómico del LF como una forma más objetiva de calidad embrionaria. El LF es un producto de las transferencia de los componentes del plasma sanguíneo y la actividad secretora de las células de teca y granulosa.¹²

El costo de la determinación individual de G-CSF en líquido folicular constituye un obstáculo económico para el uso de esta citocina como factor predictor de éxito en la TRA. Dado que estudios previos no muestran diferencias significativas en la concentración de G-CSF en el líquido folicular de ovocitos fertilizados y no fertilizados, un método alternativo de abaratar costos en estos análisis sería realizar la concentración de G-CSF en el líquido del folículo de mayor tamaño observado al realizar la captura. No existen estudios que correlacionen esta medición como predictor de éxito en técnicas de reproducción de alta complejidad.

El objetivo del estudio fue evaluar la asociación de la concentración de G-CSF en el líquido del folículo de mayor tamaño como factor pronóstico en TRA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio de casos y controles para evaluar la asociación de la concentración de G-CSF con indicadores de éxito para TRA de alta complejidad en mujeres infértiles que aceptaron participar en el estudio en el periodo de junio a diciembre de 2012 en el Instituto Nacional de Perinatología. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética institucional.

Las pacientes fueron previamente estudiadas con historia clínica, examen físico completo y estudio por factores. Se realizó: perfil hormonal, ultrasonido pélvico endovaginal, histerosalpingografía y cultivo cervicovaginal. Las pacientes con endometriosis fueron clasificadas de acuerdo a la ASRM 1996.¹³

A ambos miembros de la pareja se les realizaron cultivos especiales para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis*, serologías por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), TORCH, virus de hepatitis B y VDRL. Los varones se realizan estudios de espermatobioscopía y espermocultivo. Los resultados de la espermatobioscopía son clasificados de acuerdo al Manual de la OMS 2010.¹⁴

Hiperestimulación ovárica

Una vez completo el protocolo de estudio y tratadas las patologías crónicas de cada paciente se inició la hiperestimulación ovárica al día 2 del ciclo menstrual utilizando dos esquemas alternativos: (1) FSHr (Gondal-F; Merck Serono, Italia) o (2) FSHr y menotropinas urinarias (Merapur; Ferring Pharmaceuticals, Alemania). El protocolo de estimulación ovárica fue seleccionado por cada médico tratante: (1) protocolo largo estándar con agonista de GnRH (Lucrin; Abbott laboratorios) o (2) protocolo flexible de antagonista (Cetrotide; Merck Serono, Alemania) al alcanzar folículos de 14 mm. Se

monitorizó el desarrollo del folículo por ecografía en tiempo real y niveles de estradiol en suero desde día 5 hasta el día de captura. Una vez que se alcanzan tres o más folículos mayores de 18 mm se administra vía subcutánea Coriogonadotropina alfa 250 µg/0,5 ml (hCG recombinante Ovidrel; Serono de México). La respuesta de las pacientes a la hiperestimulación se clasificó como: baja (menor o igual a 5 ovocitos), moderada (6 a 10 ovocitos) y alta (más de 10 ovocitos).⁶ Los folículos fueron aspirados 36 horas después de la administración de la hCG con aguja de 17 ga (Cook Medical, Bloomington, IN). Se toma una muestra del LF posterior a la captura de los ovocitos para la cuantificación de G-CSF. Después de la transferencia de embriones los pacientes fueron tratados con progesterona micronizada vía vaginal (600 mg al día). La confirmación del embarazo se realiza determinando la concentración fracción beta b-hCG 15 días después de la transferencia embrionaria.

Medición de la concentración de G-CSF

Se aspiró el folículo de mayor tamaño encontrado al momento de la captura. Este se recolectó en un tubo independiente para evitar la contaminación de sangre y medio de cultivo. Estas muestras fueron colectadas, alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su análisis en conjunto. Los niveles de G-CSF en el LF fueron determinados mediante un inmuno-ensayo (ELISA, número de catálogo DCS50, R&D System, MN, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, 100 microlitros de los estándares, controles y muestras fueron colocados en las placas de 96 pozos y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron tres lavados con solución amortiguadora y se agregó 200 microlitros del conjugado de G-CSF por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió a los pozos 50 microlitros de solución de

paro y se determinó la densidad óptica mediante un sistema de lector de microplacas (GloMax, Promega, USA) a 450 nm. La G-CSF recombinante (R&D System) fue utilizada para generar la curva lineal. El ensayo no tiene reactividad cruzada con otras citocinas y reconoce tanto el G-CSF en su forma nativa como recombinante. La precisión fue de 5% intra-ensayo y de 10% inter-ensayo.

Análisis Hormonales

Los niveles hormonales fueron medidos por el ensayo IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare); un inmunoanálisis quimioluminiscente competitivo de fase sólida, altamente específico. El rango de medición de estradiol fue de 0- 2000 pg/ml (sensibilidad 15 pg /ml). El intervalo de calibración para FSH es hasta 170 mIU/ml (sensibilidad de 0.1 mIU/ml).

Técnicas de fertilización y Clasificación ovocitaria /embrionaria

Se realizaron tres técnicas de fertilización de ovocitos dependiendo de los factores alterados en la pareja así como ciclos de TRA previos: Fertilización in-vitro (FIV), Inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e Inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoide (PICSI).

Los ovocitos fueron analizados en el laboratorio de reproducción asistida para definir su estatus morfológico y se dejaron incubar por aproximadamente 4 horas para posteriormente realizar la fertilización en base a la técnica seleccionada. El porcentaje de ovocitos maduros se calculó al dividir el número de ovocitos en metafase II entre el total de ovocitos y se multiplicó por 100. El porcentaje de ovocitos fertilizados se calculó al dividir el número de ovocitos con dos pronúcleos a las 24 horas entre el total de

ovocitos y se multiplicó por 100. Al día 2 y 3 previa transferencia embrionaria se realiza la evaluación morfológica de los embriones utilizando la clasificación de Lucinda Veeck. Se subclasificaron los embriones en: Top (embriones calidad 1 y 2) y non-top (embriones calidad 3, 4 y 5).

Análisis exploratorio

Se exploró la asociación de las concentraciones de G-CSF con endometriosis, esquema de hiperestimulación, uso de agonista versus antagonista de GnRH, respuesta ovocitaria, concentraciones de estradiol el día de aplicación de hCG, técnica de fertilización utilizada, características de ovocitos obtenidos y características de embriones obtenidos.

Análisis Estadístico

Las variables sociodemográficas de la población fueron caracterizadas con estadística descriptiva. Se evaluó la distribución de las variables con prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se analizó la correlación entre variables con prueba de Pearson o Spearman según su distribución.

Para el análisis de la calidad embrionaria (clasificación morfológica de Lucinda Veeck) se asignó un puntaje arbitrario a cada embrión según su grado y se construyó un criterio de clasificación del conjunto de embriones de cada paciente para correlacionarlo con la concentración de G-CSF. Se aislaron las muestras de pacientes que contenían únicamente embriones top y las muestras con embriones non-top para comparar las concentraciones de G-CSF.

Las diferencias entre los grupos se compararon con prueba de T para muestras

independientes o U de Mann-Whitney para variables continuas.

Las concentraciones hormonales entre grupos de comparación fue analizada con prueba ANOVA y análisis post hoc de LSD; se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados son expresados en (media \pm EEM). Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20.

RESULTADOS

Características Sociodemográficas

Se eligieron 15 pacientes embarazadas que se compararon con 25 pacientes no embarazadas posterior al ciclo de fecundación in vitro. Las características de la población se muestran en el **Cuadro 1**.

La concentración media de G-CSF en el LF de las pacientes fue de 85.7 ± 7.5 pg/ml. No se encontró diferencias significativas entre las mujeres que lograron el embarazo y las que no en la concentración de G-CSF (**Figura 1**).

No se encontró diferencia en el IMC, años de infertilidad, factor masculino o la presencia de endometriosis para los grupos de embarazo y no embarazo (**Cuadro1**).

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre la edad y la concentración de G-CSF ($p= 0.33$).

El estudio de infertilidad por factores mostró una mayoría de pacientes con alteración del factor endocrino-ovárico (80%), seguido del factor tuboperitoneal (57.5%), factor masculino (45%), factor uterino (37.5%), y factor cervicovaginal (5%).

En cuanto al factor endócrino-ovárico la patología más frecuentemente encontrada fue hipotiroidismo (52.5%), seguido de hiperprolactinemia (12.5%) y resistencia a la insulina (12.5%). Otras patologías prevalentes fueron Hiperandrogenismo Funcional Ovárico (HAFO) (10%) y Síndrome de ovario poliquístico (SOP) (7.5%).

Todas las pacientes con hipotiroidismo e hiperprolactinemia estaban en control y bajo tratamiento al momento del estudio. La prevalencia de uso de Metformina fue de 12.5% en pacientes con HAFO y SOP.

Nueve mujeres (22.5%) presentaron endometriosis (únicamente mínima y leve). No se encontró correlación entre la concentración de G-CSF y las pacientes con endometriosis al compararlas con aquellas sin dicha patología (73.1 ± 14.7 vs 89.4 ± 8.7 , $p= 0.37$ respectivamente) (**Figura 2**).

Características de la Hiperestimulación Ovárica

Se utilizó esquema con FSHr en 27 pacientes (67.5%) y en 13 (32.5%) esquema combinado de FSHr y hMG. Las pacientes que utilizaron únicamente FSHr recibieron una media de 1832 ± 118 U. Las que utilizaron esquema combinado utilizaron una media de 1177 ± 185 U hMG además de 1633 ± 145 U de FSHr. No se encontró diferencia significativa en la concentración promedio de G-CSF entre los dos esquema de estimulación (78.4 ± 7.3 vs 89.3 ± 10.6 pg/ml respectivamente, $p=0.86$).

En todos los casos se utilizaron análogos de la GnRH. El 92.5% utilizó protocolo flexible de antagonista y 7.5% protocolo largo de agonista.

Al día de aplicación de hCG las pacientes presentaron una mediana de 5 (3-21) folículos mayores de 18 mm y un valor de estradiol sérico de 1671 ± 137.2 pg/ml.

No se encontró correlación entre los valores de estradiol el día de disparo y la concentración de G-CSF ($p=0.55$).

No encontramos en el presente estudio diferencias significativas en las concentraciones medias de G-CSF entre los grupos de pacientes con niveles de estradiol de disparo menores de 1500 pg/ml (82.5 ± 8.5 pg/ml), de 1501 a 3500 pg/ml (88.4 ± 13.8 pg/ml) y mayores a 3500 pg/ml (66.5 ± 23.7 pg/ml) ($p= 0,82$).

No se encontró en diferencia significativa en las concentraciones medias de G-CSF entre los grupos de pacientes con baja respuesta (70.8 ± 8.1 pg/ml), moderada respuesta (95 ± 15 pg/ml) y alta respuesta (88.2 ± 12.5 pg/ml) ($p= 0.41$) (**Figura 3**).

Características la Técnica de Fertilización Utilizada

Se realizó FIV en 18 pacientes (45%), ICSI /PICSI en 22 (55%), sin encontrar diferencia entre los grupos en las concentraciones de G-CSF (87.8 ± 8.6 vs. 86 ± 12.2 pg/ml $p=0.90$).

Características de los ovocitos obtenidos

Se obtuvo una mediana de 7,5 (2-22) ovocitos por paciente. El porcentaje de ovocitos maduros oscila entre 38 al 100% con promedio de 85% y el porcentaje de ovocitos fertilizados por paciente varía entre 15 al 100% con un promedio de 76%.

No se encontró una correlación significativa entre la concentración de G-CSF y el porcentaje de ovocitos fertilizados ($p=0.63$) o con el porcentaje de ovocitos maduros ($p=0.66$).

El estradiol del día de disparo tampoco correlacionó con la proporción de ovocitos fertilizados ($p=0.31$), encontramos una pobre correlación negativa entre éste y el porcentaje de ovocitos maduros ($\rho= 0.39$, $p= 0.02$).

Características de los embriones obtenidos

Resultaron 233 embriones: 0.4% calidad uno, 37.8% calidad dos, 30.5% calidad tres, 14.6% calidad cuatro y 16.7% calidad cinco. La calidad embrionaria no correlacionó con la concentración de G-CSF ($p=0.14$).

No se encontró diferencia significativa en las concentraciones de esta citocina al comparar embriones Top y non-Top (55.1 ± 6.4 vs. 72.7 ± 7.6 respectivamente, $p = 0.1$)

DISCUSIÓN

A diferencia de los estudios previos, realizados con mediciones individuales de G-CSF en LF, nuestro estudio evidenció que la concentración de G-CSF en el LF del folículo de mayor tamaño no tiene uso clínico como predictor de buenos resultados en estas técnicas.

Lédée y colaboradores describen que el LF de pacientes menores de 30 años tiene un mayor contenido de G-CSF que el de pacientes mayores de 37 años ($p = 0,03$).¹⁵ En este estudio no se encontró correlación estadísticamente significativa entre la edad y la concentración de G-CSF ($p= 0.332$).

En el 2001 se reporta la cuantificación de G-CSF en LF de aspiraciones de folículos de pacientes en tratamiento de fertilización in vitro y su correlación con ovocitos maduros en metafase II.¹⁶ Posteriormente otro estudio no encontró diferencias significativas en la concentración de G-CSF en el LF entre folículos con ovocitos fertilizados y no fertilizados.^{vi} En el presente estudio no se encontró una correlación significativa entre la concentración de G-CSF y el porcentaje de ovocitos fertilizados ($p= 0.63$) ni con el porcentaje de ovocitos maduros ($p=0.66$).

Foster y col. en el 2010, reportan que aquellos folículos donde se utilizó menotropinas para la hiperestimulación tuvieron mayores concentraciones de G-CSF que aquellos donde únicamente se utilizó FSH.¹⁷ Los resultados obtenidos no muestran una diferencia significativa en la concentración de G-CSF en pacientes según el tipo de medicamento utilizado en la hiperestimulación ($p=0.86$).

La concentración media de G-CSF en el LF de las pacientes fue de 85.7 DE 47.6 pg/ml. En el 2004, Salmassi y colaboradores deciden cuantificar G-CSF en LF y en suero el día de la aplicación de gonadotropina coriónica en pacientes en tratamiento de FIV,

encontrando una media de G-CSF en LF de 117.98 pg/ml.^{vi} ligeramente superior a lo encontrado en este estudio, probablemente relacionado al tipo de análogo de GnRH utilizado durante la estimulación.

En el 2008, se realizó un estudio con la intención de encontrar un factor predictivo de calidad embrionaria en el LF de cada ovocito. Se cuantificaron 28 citocinas, incluido el G-CSF, encontrando que por arriba de 20 pg/ml, el G-CSF correlaciona con embriones de muy buena calidad y capacidad de implantación.¹⁸

Según lo reportado por Salmassi, existe una correlación positiva y significativa entre las concentraciones de G-CSF y estradiol en suero en el día de la captura ($r = 0,37$; $p = 0.05$),^{iv} nuestros datos no muestran correlación entre los valores de estradiol el día de disparo y la concentración de G-CSF en LF ($p = 0.55$), así como tampoco hay una correlación al dividir estas pacientes según su estradiol el día de aplicación de hCG. Se observa una tendencia hacia mayores concentraciones de G-CSF al aumentar los niveles de estradiol hasta 3500 pg/ml, sin embargo y a pesar de que únicamente 2 pacientes tuvieron cifras mayores de éste límite, se pudo observar que los niveles de esta citocina disminuyen a concentraciones de estradiol mayores de 3500 pg/ml. Esto concuerda con lo reportado por Joo y colaboradores quienes encuentran que concentraciones muy elevadas de estradiol tienen un efecto deletéreo en la receptividad endometrial y pueden afectar directamente al embrión.¹⁹

En el 2005, Salmassi encuentra diferencias en los niveles de G-CSF entre pacientes con baja, moderada y alta respuesta ovular ($P = 0,001$), este hallazgo no se comprueba en este estudio.⁵

En el presente estudio no se encontró correlación entre la calidad embrionaria y la concentración de G-CSF ($p=0.14$). Ledee y col encuentran que en pacientes con concentraciones de G-CSF por arriba 20 pg/ml la proporción de embriones Top vs non-Top era significativamente mayor, en el presente estudio no se encontró diferencia en la concentración de G-CSF entre embriones Top y non-Top ($p= 0.11$).¹⁵

Previamente se ha establecido que la concentración de G-CSF en pacientes con endometriosis es significativamente menor que en las que no presentan esta patología.^{lv}

En este estudio no se encontró correlación entre la concentración de G-CSF y las pacientes con endometriosis al compararlas con aquellas sin dicha patología ($p= 0.37$); esto podría deberse a los grados de la endometriosis encontrados ya que únicamente se encontraron casos con enfermedad mínima o leve.

Salmassi y col. no encuentran una mayor concentración de G-CSF para las pacientes que utilizaron ICSI con respecto a las que utilizaron FIV ($p= 0.02$),⁶ probablemente en relación a una mejor calidad ovocitaria en las pacientes con factor masculino, sin embargo en nuestro estudio no se encontró diferencia entre estos grupos (87.8 ± 8.6 pg/ml vs 86 ± 12.2 pg/ml $p=0.9$) probablemente debido a que en nuestra población la indicación de ICSI no se limitó a factor masculino.

Se necesitan en el futuro estudios prospectivos de mayor tamaño para determinar la utilidad de medir G-CSF en LF.

CONCLUSION

El abordaje metabolómico es una herramienta poderosa en el estudio del LF como predictor de éxito en las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad. El presente estudio muestra que la concentración de G-CSF en LF del mayor folículo en la captura ovular, no se correlaciona con tasas de embarazo por lo que se necesitan más estudios para determinar su uso en la práctica clínica.

TABLAS Y GRÁFICOS

Cuadro 1. Características de la población estudiada.

| | <u>Embarazo</u> n= 15 | <u>No embarazo</u> n= 25 | p |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------|------|
| Edad : media (EEM) | 33.1 (5) | 34.6 (6) | 0.20 |
| IMC: media (EEM) | 25.5 (4.2) | 24.4 (3) | 0.36 |
| Años de Infertilidad: media (EEM) | 5.8 (2.3) | 6.1 (4) | 0.85 |
| Folículos mayores de 18mm (EEM) | 8.1 (1.2) | 6 (0.6) | 0.14 |
| FSH día 3 (EEM) | 7 (0.6) | 7.1 (0.8) | 0.90 |
| Estradiol día 3 (EEM) | 51.3 (7.8) | 36.4 (3.8) | 0.10 |
| Factor Masculino: n (%) | 8 (53.3) | 10 (40) | 0.31 |
| Endometriosis: n (%) | 2 (13.3) | 7 (28) | 0.25 |

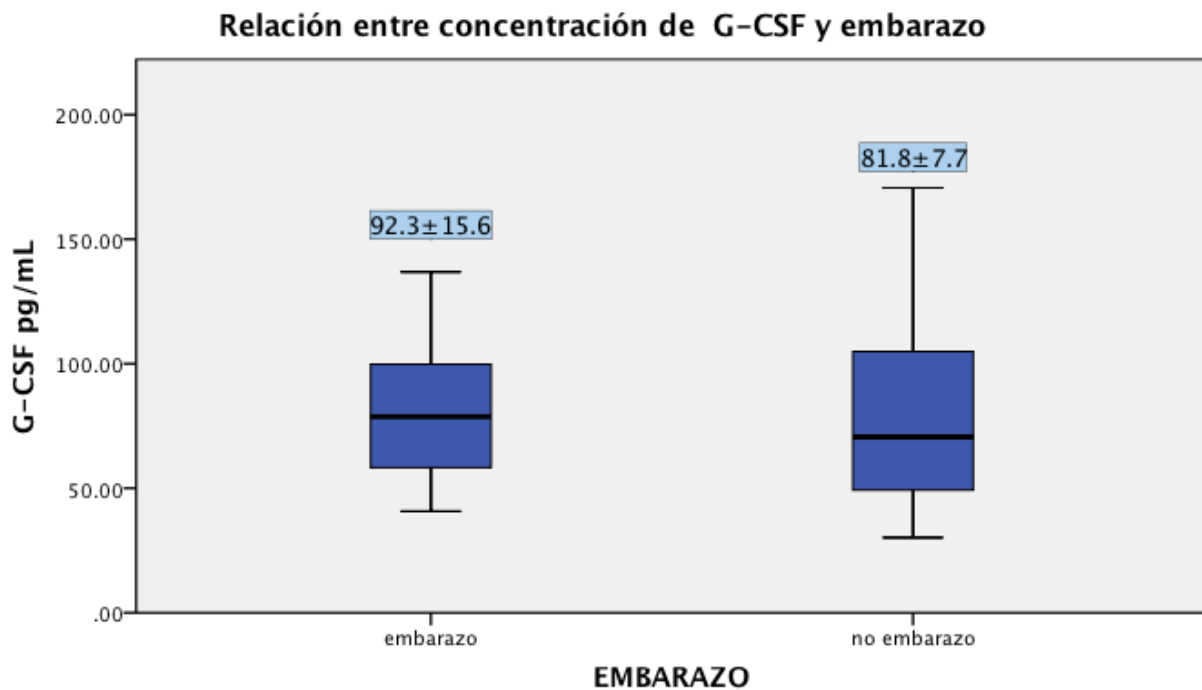


Figura 1

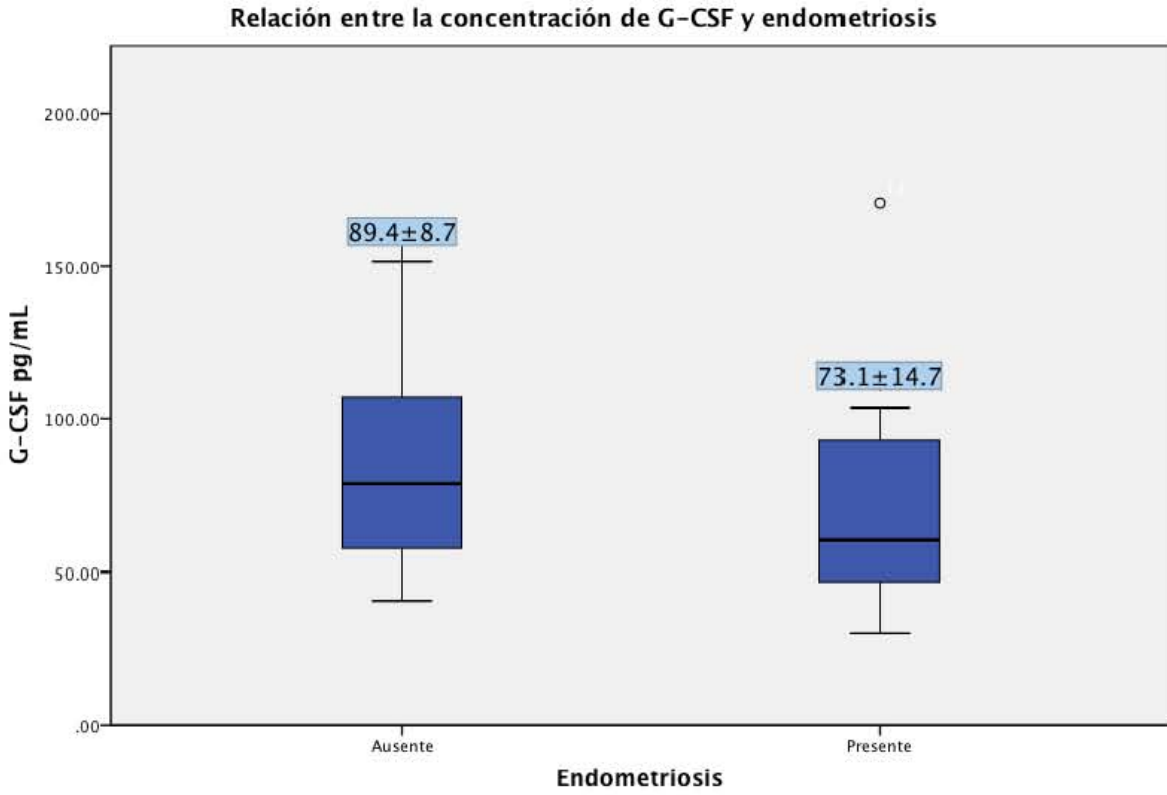


Figura 2

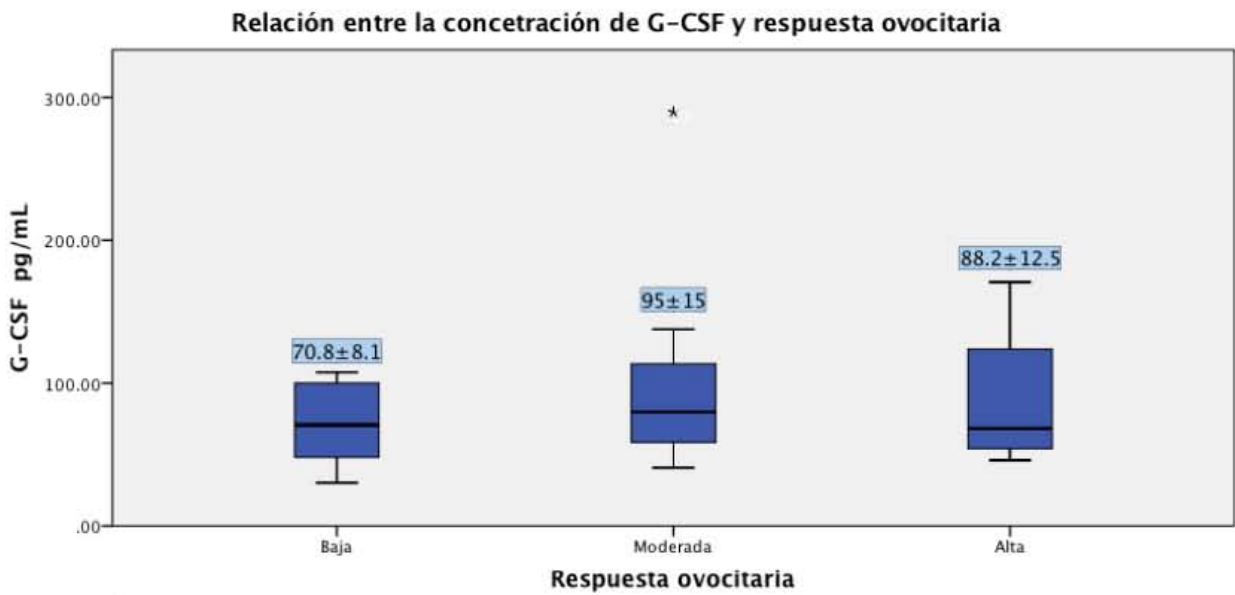


Figura 3

REFERENCIAS

- ¹ Gutierrez-Delgado F, Bensinger W. Safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Curr Opin Hematol* 2001; 8:155–160.
- ² Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood* 1991; 78: 2791–2808.
- ³ Salmassi A, Schmutzler G, Huang L, Hedderich J, Jonat W, Mettler L. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulose cells. *Fertil Steril* 2004; 81: 786-791.
- ⁴ Santibáñez-Morales A, Bagnarello F, Sánchez-Serrano AP, De la Jara JF. Factor estimulante de colonias de granulocitos y su efecto en el ámbito reproductivo. *Rev Mex Reprod* 2012; 4 (4):147-152.
- ⁵ Salmassi A., Mettler L, Walter J, Sybille B, Kerstin K, Schmutzler A. Circulating level of macrophage colony-stimulating factor can be predictive for human in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2010; 93:116-123.
- ⁶ Salmassi A, Schmutzler A, Schafer S, Koch K, Hedderich J, Jonat W et al. Is granulocyte colony-stimulating factor level predictive for human IVF outcome? *Hum Reprod* 2005;20: 2434-2440.
- ⁷ Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 1999;14 :3069-3076.
- ⁸ Sjoblom C, Wikland M, Robertson S. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Acts Independently of the Beta Common Subunit of the GM-CSF

Receptor to Prevent Inner Cell Mass Apoptosis in Human Embryos. *Biol Reprod* 2002;67:1817-1823.

⁹ Siristatidis C, Vogiatzi P, Salamalekis G, Creatsa M, Vrachnis N, Glujovsky D. Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Supplementation in Culture Media for Subfertile Woman Undergoing Assisted reproduction Technologies: A systematic review. *International journal of Endocrinology*. Volume 2013. Article ID 704967.

¹⁰ Sarapik A, Velthut A, Haller-Kikkatalo K, Faure G, Bené M-C, De Carvalho M, et al. Follicular proinflammatory Cytokines and Chemokines as markers of IVF Success. *Clinical and Developmental Immunology*. Vol 2012. Article ID 606459, 10 pages, 2012. Doi: 10.1155/2012/606459.

¹¹ Balaban B, Urman B: Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006, 12: 608-615.

¹² Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009; 7: 40 doi:10.1186/1477-7827-7-40.

¹³ American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification for endometriosis 1996. *Fertil Steril* 1997;67: 817-21

¹⁴ WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 2010. 5th ed. World health Organization, Department of Reproductive Health and research.

¹⁵ Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008; 23: 2001 – 2009.

¹⁶ Kawano Y, Kawasaki F, Nakamura S, Matsui N, Narahara H, Miyakawa I. The Production and Clinical Evaluation of Macrophage Colony-Stimulating Factor and Macrophage Chemoattractant Protein-1 in Human Follicular Fluids. *Am J Reprod Immunol* 2001; 45:1– 5.

¹⁷ Foster R, Segers I, Smart D, Adriaenssens T, Smitz T, Arce J, et al. A differential cytokine expression profile is induced by highly purified human menopausal gonadotropin and recombinant follicle-stimulating hormone in a pre- and postovulatory mouse follicle culture model. *Fertil Steril*, 2010; 93:1464–76.

¹⁸ Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008; 23: 2001 – 2009.

¹⁹ Joo BS, Park SH, An BM, Kim KS, Moon SE, Moon HS. Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration dependent manner. *Fertil Steril* 2010; 93:442–6.