
Número Especial XXVI Congreso Nacional de la SEF

Pág

Saludo de bienvenida	5
Comité Organizador y Científico	8
Ponencias	
– Taller de genética: genética de la reproducción humana para ginecólogos	15
– Actualidad de la laparoscopia diagnóstica en el estudio de la pareja estéril	21
– Hiperandrogenismo, resistencia a la insulina y síndrome de ovario poliquístico	27
– Conducta reproductiva ante el semen potencialmente infeccioso	34
– Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida	42
– Predicción de la respuesta ovárica en ciclos de fecundación asistida	53
– Avances farmacológicos en el tratamiento del Síndrome del Ovario Poliquístico	65
– Endometriosis y medicina basada en la evidencia	73
– Cirugía y/o Reproducción Asistida en la endometriosis	76
– Criopreservación de ovocitos y tejido ovárico	80
– Aspectos no reproductivos del fallo ovárico	89
– Estado actual de la investigación en contracepción masculina	91
– Biología de la reproducción para ginecólogos	99
– Epidemiología de la esterilidad en España	114
– Esterilidad idiopática. Año 2006	116
– Intervención sobre el embrión para mejorar su capacidad implantatoria	131
– Receptividad uterina e implantación	141
– LH y su papel en la estimulación ovárica	144

– Los agonistas de la dopamina (Cabergolina) previenen el síndrome de hiperestimulación ovárica moderado-severo en pacientes de riesgo	152
Comunicaciones Orales Seleccionadas	155
Comunicaciones Orales	163
Comunicaciones en Poster	213

PONENCIAS

Taller de genética: genética de la reproducción humana para ginecólogos

Dra. M^a Isabel Tejada

Laboratorio de Genética Molecular. Hospital de Cruces. Barakaldo-Bizkaia

ÍNDICE

0.- INTRODUCCION: LA GENETICA EN LA MEDICINA ACTUAL

1.- PRINCIPIOS BÁSICOS:

- * El ADN y ARN
- * Los genes
- * Las técnicas para estudio

2.- ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS:

- * Tipos
- * Transmisión y Riesgo en la descendencia
- * Prevención: Diagnóstico prenatal, preimplantacional, etc.
- * Anomalías cromosómicas del desarrollo y función gonadales anómalos y de la infertilidad masculina y femenina.

3.- ENFERMEDADES MENDELIANAS:

- * Herencia Autosómica
- * Herencia ligada al sexo
- * Prevención: Diagnóstico prenatal, preimplantacional, etc.
- * Mutaciones de genes responsables del desarrollo y función gonadales anómalos y de la infertilidad masculina y femenina.

4.- ÚLTIMAS REFLEXIONES

5.- BIBLIOGRAFÍA

0.- INTRODUCCIÓN: LA GENÉTICA EN LA MEDICINA ACTUAL

La Medicina del siglo XXI no puede ser entendida sin considerar las aportaciones de la Genética moderna, cuyos avances espectaculares –como el desciframiento del Genoma Humano– están desvelando nuevos conocimientos en relación con la etiología, fisiopatología, diagnóstico y, en algunos casos, tratamiento, de muchas enfermedades. De la mano de la ingeniería genética, la biología molecular, y las potentes herramientas en genómica y proteómica, asistimos hoy día a un prodigioso cambio en la Sanidad: los avances son constantes y muy rápidos, y tienen implicaciones inmediatas en el manejo de los pacientes y familias afectados y/o portadores de enfermedades genéticas. Incluso los diversos medios de comunicación de nuestro país (prensa, radio y televisión y por supuesto el Diario Médico) no son ajenos a ello, y cualquiera puede seguir casi todos los días el descubrimiento de tal o cual gen y sus posibles aplicaciones a las más diversas enfermedades.

Sin embargo, la mayoría de las Facultades de Medicina en España no han sabido todavía subirse al carro de estos avances genéticos y ni tan siquiera forman a los futuros médicos en los aspectos más básicos de la Genética. En algunos sitios existen asignaturas de Genética y Citogenética, pero sólo en primero o segundo de Medicina y con muy poca relación con la clínica, de tal forma que, años más tarde, el futuro especialista no puede relacionar esos conocimientos con su práctica clínica diaria.

Es por ello que, cuando me propusieron este Taller de Genética, acepté gustosa. Incluir este Taller en un Congreso de la SEF es algo que honra a los Presidentes de la SEF y del Comité organizador, a los que, desde estas líneas, les agradezco esta invitación. A lo largo de mis casi 30 años de trabajo en Genética Clínica he sido testigo de cómo la Genética ha ido invadiendo todas las especialidades de la Medicina, pero lo que nunca olvidaré, es que mi andadura empezó precisamente en un Servicio de Ginecología y Obstetricia –el Clínico de Barcelona–, y en un programa, que el Doctor Albert Fortuny creó y llamó “Citogenética aplicada a la Reproducción”, nombre muy similar al taller que ahora imparto. Es por lo tanto un gran placer y un honor para mí el desarrollarlo.

Poner por escrito este Taller no es tarea fácil. Porque se me ocurre que hay que explicar todo lo que he escrito en el índice, pero eso sería como escribir un libro completo de Genética. Una ponencia en cambio acostumbra a ser de actualidad: el ponente tiene

que versar y escribir sobre lo último en su campo o sobre su trabajo propio. Pero, si escribo aquí sobre lo último en Genética de la Reproducción, no podría entonces explicar los fundamentos más básicos de la Genética, pilar necesario e imprescindible en este Taller, para poder sentar las bases por lo menos, de una pequeña y cuando menos clara formación en genética, que es lo que aquí me gustaría darles.

Tomen por lo tanto el índice y estas líneas sólo como una guía para seguirme en el Taller. Pero además, lo que me ha parecido importante también, es que puedan Ustedes tener esos libros y revisiones que yo no tengo sitio para resumir aquí. Existen en este momento excelentes libros sencillos de Genética para el clínico, y numerosas revisiones y páginas Web en las que se puede consultar de una forma fácil. Todas estas herramientas las encontrarán en la Bibliografía que les adjunto y que espero les sea útil.

1.- PRINCIPIOS BÁSICOS

La gran sorpresa del desciframiento del Genoma Humano ha sido el saber que sólo tenemos unos 22.000-24.000 genes en esos 3.000 millones de pares de bases que constituyen el ADN o molécula fundamental de la herencia. La mayoría del ADN, el 95-99%, no tiene genes y se considera por ello “ADN basura”. Los genes están dispersos en el ADN y se distribuyen en 23 pares de cromosomas, 22 de ellos llamados autosomas, comunes para hombres y mujeres, y un par de cromosomas sexuales. Para cada gen autosómico existen dos copias, una de procedencia materna y otra de procedencia paterna, llamadas alelos: el alelo paterno y el alelo materno. Lo mismo pasa en la mujer con el cromosoma X. Ambos alelos se separan a su vez en la gametogénesis, proceso biológico fundamental para entender toda la Genética de la Reproducción Humana. Recordaremos en el Taller que los cromosomas se separan por medio de la meiosis, división celular doble en la que se produce el “crossing-over” o intercambio de crómatidas, mecanismo importante para entender la segregación de los genes de una generación a la siguiente.

Un gen es un fragmento de ADN que codifica una proteína. Este era uno de los dogmas de la Genética hasta hace poco, pero hoy día sabemos que el 50% de los genes tienen lo que llamamos mecanismos de “splicing” alternativos, de tal forma que, aunque sólo tengamos unos 24.000 genes, existen unas 100.000 proteínas. Para entender lo que es el “splicing”, revisaremos la estructura de los genes, constituidos por exones e intrones, estos últimos siendo los fragmen-

tos que se eliminan por ese mecanismo para producir el ARN o segunda molécula de la herencia, intermedia entre el ADN y las proteínas. Cada gen contiene por lo tanto información variada para ejercer una función determinada y específica en diferentes procesos, como el desarrollo estructural y morfológico del organismo, el control de la función celular, la actividad enzimática, la regulación de diversas vías metabólicas, etc. Pero hay también otros genes que no codifican proteínas, sino que dan directamente moléculas de ARN funcionales por sí mismas como reguladoras de otros genes.

Para estudiar los genes y los cromosomas, la Genética tiene dos partes bien diferenciadas que son la Citogenética y la Genética Molecular. Ambas constituyen dos ramas de la Genética, siendo sus laboratorios y tecnología muy diferentes, aunque hoy día existe el nexo de unión que es la llamada Citogenética molecular.

La Citogenética es el estudio de los cromosomas, para el que se requiere que las células del tejido que sea estén en mitosis (o meiosis) y por lo tanto haya un cultivo celular. El cariotipo o mapa conjunto de todos los cromosomas se analiza por medio de bandas, técnica que tiene como límite de resolución unas 2-10 megabases (millones de pares de bases) según se utilicen técnicas convencionales o de alta resolución.

Para la Genética molecular no se necesitan células vivas: se puede extraer ADN de cualquier tipo de célula nucleada, viva o no, hasta de especímenes guardados durante años. Pero para analizar el ADN, el problema que se tiene que solventar es la tremenda longitud del mismo, del cual como hemos dicho sólo un porcentaje muy pequeño es codificante y por ello, desde el principio fue evidente que sólo se podría hacer estudiándolo por fragmentos. El primer paso se dio gracias al descubrimiento, a principios de los años 70, de unos enzimas que actuaban como "tijeras" cortando el ADN: las endonucleasas de restricción, cuyos fragmentos resultantes se pueden estudiar por medio de sondas, descubriéndose una técnica fundamental todavía en uso: El Southern Blot. Quince años más tarde llegó la técnica que "revolucionó" los estudios genéticos, la PCR o amplificación en cadena de la Polimerasa, gracias al descubrimiento de otro enzima: la Taq polimerasa, que permite amplificar "In vitro" fragmentos muy concretos. Estas dos familias de enzimas son auténticas herramientas en la Genética molecular, como lo son también las sondas, las técnicas de electroforesis, etc., gracias a las cuales es posible hoy día realizar cualquier análisis molecular. En este taller abordaremos de una forma muy resumida todo ello, suficiente como para poder enten-

der otras técnicas como las del Diagnóstico preimplantacional.

El desarrollo de las técnicas de Citogenética molecular como la hibridación in situ fluorescente (FISH) permite hoy día detectar reordenamientos cromosómicos intermedios entre lo detectable con la resolución del análisis citogenético de alta resolución y con las técnicas moleculares. De una forma general, se usa el FISH cuando una única secuencia de un gen o un grupo de genes se conoce y la enfermedad en cuestión es el resultado de la pérdida o ganancia de esta región. Esta secuencia única, conocida como región crítica marcada con fluorescencia se utiliza como sonda. Si la región crítica está presente, la sonda fluorescente hibridará, es decir se unirá con ella y será visible cuando se examine con un microscopio de fluorescencia.

2.- ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

Las anomalías cromosómicas son una de las causas importantes de la producción de anomalías congénitas y de infertilidad y/o subfertilidad. La incidencia es muy variable en las series existentes pues dependen de la selección de pacientes que se haga, y de las técnicas de laboratorio utilizadas. Clásicamente se dividen en anomalías numéricas (las que alteran el número de cromosomas), anomalías estructurales como deleciones, traslocaciones, duplicaciones, etc., y los mosaicos que son aquellas anomalías que se encuentran en una parte de las células.

La mayoría de las anomalías cromosómicas numéricas producen una alteración tal del fenotipo que son incompatibles con la vida. Se sabe que en el 12-15% de los abortos espontáneos existe una anomalía numérica y se estima que las anomalías cromosómicas en general son responsables del 50% de las pérdidas del primer trimestre pero sólo del 5% de las pérdidas fetales después de las 28 semanas de embarazo. De todas ellas, el 95% son numéricas y una de las más frecuentes es la monosomía X o Síndrome de Turner. Entre los casos que llegan a nacer y son responsables de infertilidad también nos encontramos con casos de S. de Turner, y además otras anomalías de los cromosomas sexuales como el Síndrome de Klinefelter (XXY), la triple X (XXX) que produce menopausia precoz y todas las demás variantes y mosaicos.

Las anomalías estructurales son menos frecuentes que las numéricas encontrándose en un 0,9% de las concepciones reconocibles. Hay que tenerlas muy presentes en la infertilidad masculina pues el 4-5% de los hombres con un espermiograma alterado puede te-

ner una anomalía estructural. Entre las anomalías estructurales que producen infertilidad y/o fallos reproductivos están los isocromosomas (como los de brazos cortos y largos del cromosoma X), las microdeleciones del Y, las inversiones, las traslocaciones Robertsonianas y las recíprocas como las X/autosoma entre otras. Todas ellas son detectables en citogenética convencional o por medio de FISH para las más pequeñas.

Las anomalías cromosómicas que no implican ni una discapacidad intelectual grave ni una esterilidad absoluta son transmisibles, por lo que hay que estudiar el riesgo de transmisión y su prevención en cada caso. El Consejo Genético es la forma de abordar adecuadamente esa medicina –nunca mejor dicho individualizada– en estos casos, pues cada anomalía estructural es prácticamente única y las opciones para la pareja son variadas: Diagnóstico prenatal por amniocentesis, por biopsia de vellosidades coriales, diagnóstico preimplantacional, donación de gametos, etc. Cada caso ha de ser objeto de una muy precisa valoración pues, con los avances de la genética no existen grandes barreras técnicas, pero las opciones a escoger dependerán del equipo que se tenga, de las disponibilidades económicas y técnicas, de los condicionantes sociales, culturales, económicos y religiosos de la pareja, etc.

De la misma forma es importante el Consejo Genético para el Diagnóstico prenatal de las anomalías numéricas, en donde hoy día se compite por hacer un diagnóstico cada vez más rápido, teniendo en cuenta las posibilidades que nos ofrecen tanto las técnicas de FISH como la QF-PCR. Estas técnicas no tienen una fiabilidad tan completa como el cariotipo, pero es importante recordar que al final, ninguna técnica es la garantía total y absoluta de un niño sano: El diagnóstico preimplantacional no diagnosticará los mosaicos; el estudio cromosómico en biopsia de corion también puede dejar de lado los mosaicos; el cariotipo en líquido amniótico aunque siga siendo la técnica citogenética más fiable tiene los inconvenientes de la gestación más avanzada, etc. Todo ello habrá que discutirlo con la pareja y decidir en consecuencia la técnica de elección en cada caso.

3.- ENFERMEDADES MENDELIANAS:

Entendemos por enfermedad mendeliana aquella que está originada por mutaciones en un sólo gen. Como los avances en Genética han acelerado la identificación de nuevos genes, ha aumentado enormemente nuestro conocimiento acerca de la asociación

entre mutaciones (variantes genéticas del ADN que alteran la función del gen) y enfermedad. Las mutaciones pueden ser de muy diversos tipos, siendo las más frecuentes pequeñas deleciones o pérdidas de alguna base, o cambios de una base por otra que llevan a un cambio de un aminoácido por otro.

Las enfermedades cuyos genes responsables están en los autosomas reciben el nombre de autosómicas. Si la sola presencia de una mutación en un alelo produce la enfermedad, decimos que existe una transmisión dominante, y la enfermedad será autosómica dominante (AD). Si se necesitan dos mutaciones en cada alelo respectivo hablamos de enfermedades recesivas (AR). Las enfermedades AD son en general menos graves y por lo tanto nos encontraremos con individuos que desearán procrear y que solicitarán prevención. En el caso de las AR, los que solicitan normalmente un método reproductivo adecuado para prevenir la enfermedad son los portadores sanos, diagnosticados a partir de algún individuo afectado en la familia.

Las enfermedades cuyos genes se encuentran en el cromosoma X se llaman ligadas al X (X-L). La mayoría son recesivas pero existen algunas dominantes entre las que se encuentra una de las más frecuentes: El Síndrome X Frágil (SXF).

Para cualquier enfermedad mendeliana, el diagnóstico preciso de la mutación implicada es el elemento clave para el paciente y su familia. Pero no sólo es importante el diagnóstico, sino también su correcta interpretación, y el conocimiento de cada enfermedad genética. Por ejemplo, tomando como modelo el SXF, hoy día sabemos que es una enfermedad dominante, lo que quiere decir que hay mujeres afectadas y que por ello, un diagnóstico preimplantacional con implantación de fetos femeninos –como algunos preconizan– no se debe realizar. Pero además, hay otro estadio en el SXF llamado de “premutación” en el que las mujeres son normales de inteligencia pero portadoras y, curiosamente, algunas pueden presentar POF y menopausia precoz. En estas, la estimulación ovárica puede responder mal, pero no en todas las portadoras. Nuevamente, la consulta de Consejo Genético será donde, a partir del árbol, de la historia clínica, de la interpretación del diagnóstico molecular, se precisará la mejor estrategia para abordar tanto el diagnóstico como su prevención posterior, el estudio de los riesgos de recurrencia y el manejo integral de la familia.

Otro ejemplo de que un mismo gen puede producir dos tipos de enfermedades, se da en la fibrosis quística del páncreas (gen CFTR). Además de la clá-

sica enfermedad, producida en recesividad, algunos varones portadores en heterocigosidad (un solo alelo mutado) pueden presentar ausencia congénita bilateral de los vasos deferentes, de tal forma que este gen es el responsable del 1% de la infertilidad masculina.

La mayor sorpresa que nos está deparando por lo tanto el Genoma Humano es que un gen puede tener diversas funciones. Si ya hemos dicho que el “splicing” diferencial puede hacer que se produzca una proteína u otra, otro gran descubrimiento ha sido que el desarrollo de muchos procesos biológicos no sólo está determinado por los genes, sino también por factores epigenéticos, siendo la metilación uno de los más relevantes. La metilación es una modificación química de los nucleótidos que constituyen el ADN, que conduce a la activación/inactivación de un alelo preferencial con respecto a su homólogo, dependiendo de su origen paterno o materno. Esto es lo que se denomina impronta genética o “imprinting”. Alteraciones en dicho proceso dan lugar al desarrollo de diferentes síndromes bien conocidos hoy día, y se sospecha que pueden estar en el origen de diversas anomalías que se producen tras técnicas de reproducción asistida como el ICSI.

El complejo conocimiento que se tiene en la actualidad sobre las causas de las enfermedades genéticas y de la reproducción humana, hace imprescindible que los pacientes se sientan seguros, asesorados adecuadamente por profesionales con una sólida formación en Genética. Por ejemplo, sólo en el campo de la reproducción sabemos ya que unos 10 genes actúan en dominancia (AD), produciendo anomalías en el desarrollo y/o función gonadal, alguno incluso con efecto de “imprinting” y otros que también pueden ser recesivos. Hay otros 20 genes más conocidos AR, algunos actuando a veces en dominancia y, en el cromosoma Y, hay genes importantes en la diferenciación sexual, cuyas mutaciones están en el origen de situaciones de intersexo como el gen SRY, así como el DAX1 en el cromosoma X. Otros genes también implicados en desórdenes gonadales son el DAZ, RBMY, y USP9Y en el cromosoma Y y, en el cromosoma X además del gen del SXF ya mencionado (el FMR1) tenemos genes como el ATRX y el AR. Y es que, dada la complejidad de la función reproductora, numerosos genes han de estar implicados, muchos de ellos todavía no conocidos o menos estudiados: los genes de las hormonas esteroideas, los genes que actúan en el hipotálamo; genes de la pituitaria, los que actúan directamente sobre la gónada, etc. Podremos ir viendo en el taller algunos de ellos un poco más en profundidad, si interesa a los participantes.

4.- ÚLTIMAS REFLEXIONES

No quisiera terminar sólo con esa lista de genes, cada uno de ellos poco frecuente en sí mismo, sino también con aquellos de los mencionados que, en estado de heterocigosidad, es decir de portadores, son frecuentes en nuestra población. Se trata en concreto del gen FMR1 del Síndrome X Frágil y del gen de la fibrosis quística. En estos momentos en que las técnicas de reproducción asistida se multiplican, que la oferta de diagnóstico preimplantacional es cada vez más amplia, y que se requieren cada vez más donantes, es importante que éstos estén bien chequeados genéticamente en función de la finalidad para la que van a ser utilizados. Y, caso de encontrar anomalías genéticas en ellos, deberán ser tratados como un paciente más, recibiendo una consulta de Consejo Genético adecuada para su posterior futuro reproductor.

Aconsejo finalmente las “Recomendaciones sobre temas de ética en Obstetricia y Ginecología hechas por el Comité para los Aspectos Éticos de la Reproducción Humana y Salud de la mujer de la FIGO”, en todo aquello que se refiere a la necesidad de soporte psicológico y de asesoramiento genético en todos aquellos casos de pacientes en los que haya anomalías genéticas. El avance de la Genética en Medicina está siendo tan espectacular, que debe ir en paralelo al desarrollo de los aspectos profesionales, éticos, legales y sociales que aseguren la accesibilidad, seguridad y equidad en los procedimientos y prestaciones genéticas y en la reproducción. Espero que con este taller pueda contribuir un poco más a elevar los conocimientos sobre estos temas y su aplicación que, a buen seguro redundará en el buen hacer de las técnicas reproductivas y por ende, del futuro de la sociedad en general.

5.- BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Libros:

1. **Aimé S, Martínez-Castellano F, Gabau E, y cols.:** Curso de Genética Clínica, Madrid: Editorial Garsi, 1997.
2. **Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al.:** Essential Cell Biology, 2nd ed. New York: Garland Science, 2004.
3. **Skirton H and Patch C.:** Genetics for Healthcare professionals: A lifestage approach, Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd, 2002.
4. **Thompson and Thompson.** Genética en Medicina, 5ª ed. Barcelona, Masson Ed., 2003.

5. **Westman JA.:** Medical Genetics for the Modern Clinician. Baltimore, Maryland. USA: Lippincott Williams&Wilkins, 2006.
 6. **Wilson GN.:** Clinical Genetics: A short course. New York: Wiley-Liss, 2000.
- Artículos:**
7. **Aittomaki K, Wennerholm UB, Bergh C, Selbing A, Hazekamp J, Nygren KG.:** Safety issues in assisted reproduction technology: should ICSI patients have genetic testing before treatment? A practical proposition to help patient information. Hum Reprod. 2004; 19: 472-6.
 8. **Aknin-Seifer IE, Lejeune H, Touraine RL, Levy R.:** Societe d'Andrologie de Langue Francaise Y chromosome microdeletion screening in infertile men in France: a survey of French practice based on 88 IVF centres. Hum Reprod. 2004; 19: 788-93.
 9. **Antñolo G.:** Utilidad de la Genética para el Obstetra. Progr Diag Trat Prenat 2005; 17: 171-182.
 10. **Burke W.:** Genetic testing. N Engl J Med 2002; 347: 1867-1875.
 11. **Clayton EW.:** Ethical, legal, and social implications of genomic medicine. N Engl J Med 2003; 349: 562-569.
 12. **Damewood MD.:** Ethical implications of a new application of preimplantation diagnosis. JAMA 2001; 285: 3143-3144.
 13. **Epstein CJ.:** Is modern genetics the new eugenics? Genetics in Medicine 2003; 5: 469-475.
 14. **Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M.:** Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. Lancet 2003; 361: 1975-77.
 15. **Jarzabek K, Zbucka M, Pepinski W, Szamatowicz J, Domitrz J, Janica J, Wolczynski S, Szamatowicz M.:** Cystic fibrosis as a cause of infertility. Reprod Biol. 2004; 4: 119-29.
 16. **Layman LC.:** Human gene mutations causing infertility. J Med Genet. 2002; 39: 153-61.
 17. **Linden MG, Bender BG, Robinson A.:** Intrauterine diagnosis of sex chromosome aneuploidy. Obstet Gynecol 1996; 87: 468-475.
 18. **MacLaughlin DT, Donahoe PK.:** Sex determination and differentiation. N Engl J Med 2004; 350: 367-378.
 19. **Maher ER.:** Imprinting and assisted reproductive technology. Hum Mol Genet. 2005; 14 Spec No 1: R133-8.
 20. **Moldenhauer JS, Ostermeier GC, Johnson A, Diamond MP, Krawetz SA.:** Diagnosing male factor infertility using microarrays. J Androl. 2003; 24: 783-9.
 21. **Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK.:** The genetic basis of infertility. Reproduction. 2003; 126: 13-25.
 22. **Sun F, Ko E, Martin RH.:** Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? Reprod Biol Endocrinol. 2006; 25:1.
 23. **Valle D.:** Genetics, individuality, and medicine in the 21st century. Am J Hum Genet 2004; 74: 374-381.
 24. **Vastag B.:** Merits of embryo screening debated. JAMA 2004; 291: 927-929.
- Páginas Web sugeridas:**
1. <http://www.genome.gov>
 2. <http://www.nhgri.nih.gov/PolicyEthics>
 3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
 4. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) from Johns Hopkins University contains a search engine for disorders and genes.
 5. <http://www.nsgc.org>
 6. The web site of the National Society of Genetic Counselors
 7. <http://www.asrm.org>
 8. The web site of the American Society of Reproductive Medicine
 9. <http://www.acog.org>The Web site of the American College of Obstetrics and Gynecology.
 10. <http://www.figo.org>
 11. The Web site of the International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Actualidad de la laparoscopia diagnóstica en el estudio de la pareja estéril

Dr. Alberto Ascenzo Palacio

En los últimos años el estudio y tratamiento de la pareja con problemas de esterilidad ha evolucionado en forma notable y esto se ve especialmente por la mayor edad de las pacientes que acuden a la consulta especializada y a la mejora de los resultados obtenidos por las técnicas de reproducción asistida (TRA), esto a hecho que muchas parejas sean sometidas a técnicas de reproducción asistida sin haber completado su estudio diagnóstico o que acudan al especialista directamente en busca de estas técnicas.

El típico estudio de la pareja estéril que incluye espermograma, prueba post coital, histerosalpingografía, biopsia de endometrio y laparoscopia diagnóstica ha sido muy discutido y criticado (1), fundamentalmente porque algunas pruebas clásicas han demostrado poca utilidad y escaso valor pronóstico (2, 3).

Algunos autores desechan el término laparoscopia diagnóstica, pero en reproducción esta vigente, sobre todo cuando encontramos una histerosalpingografía anormal, esterilidad de causa desconocida, o sospecha de endometriosis. Los defensores de la laparoscopia diagnóstica afirman que este procedimiento tiene un papel esencial en el tratamiento de la esterilidad porque además de que nos permite evaluar el estado de las trompas uterinas, identificar la endometriosis y ubicar adherencias pélvicas para luego dependiendo de estos resultados se pueda convertir en operatoria para solucionar estas alteraciones (4,5). Basándonos en estos conceptos veremos la importancia de la laparoscopia diagnóstica en los problemas de fertilidad.

La patología tubárica representa un porcentaje muy importante en los problemas de fertilidad, la cual se estima tiene una prevalencia en aumento (6). En el Perú la encontramos presente entre el 36.4% al 54.3%(7,8).

El valor predictivo de un examen es el producto de la prevalencia de la enfermedad en una población específica. En general, entre mas diseminada este la enfermedad, mayor es la sensibilidad y especificidad de la herramienta de diagnóstico; una mayor prevalencia de enfermedad tubárica claramente soporta la laparoscopia (9). Sin embargo su uso será controversial en aquellas pacientes de bajo riesgo para enfermedad tubárica.

La histerosalpingografía es utilizada como examen básico en los estudios de fertilidad, cuando esta se realiza en forma correcta nos proporciona importante información respecto a la permeabilidad de las trompas, el calibre que estas presentan, las características del endosalpinx. Además de las características de la cavidad uterina y cervix. Incluso un radiólogo con experiencia en este tipo de interpretaciones nos puede informar con respecto a posibles adherencias pélvicas. Sin duda, si los resultados de la histerosalpingografía son anormales o sospechosos, el estudio laparoscópico esta indicado. La discusión es se debe efectuar una laparoscopia cuando la histerosalpingografía es normal y en que momento la debemos hacer.

Opsahl y cols. (10) estudiaron retrospectivamente 756 pacientes estériles a las que se le había practicado histerosalpingografía y laparoscopia diagnóstica. De las 327 pacientes con histerosalpingografía diagnosticada como normal, 316 tenían permeabilidad tubárica, pero 155 de estas tenían evidencia de enfermedad pélvica. De las que presentaban enfermedad leve 50.9% tenían endometriosis y 40.5% presentaban adherencias pélvicas.

Cuando los resultados de la histerosalpingografía fueron sospechosos el 53.9% presentaba patología pélvica de moderada a severa.

Si el resultado de la histerosalpingografía resulto anormal el 93.5% de las pacientes presentaron altera-

ciones pélvicas y de estas el 81.7% era enfermedad pélvica de moderada a severa.

El-Yahia (11) describió los resultados laparoscópicos en 130 pacientes con histerosalpingografía normal, la laparoscopia diagnóstica se efectuó al finalizar el estudio diagnóstico de la pareja estéril. En este estudio retrospectivo solo el 42.3% presentó una pelvis catalogada como normal.

Nosotros encontramos en un trabajo presentado por Vergara (8) en 200 pacientes estériles, con estudio de fertilidad que incluía histerosalpingografía, histerosonografía y laparoscopia diagnóstica, 116 consideradas normales a la histerosalpingografía tenían permeabilidad tubárica conservada a la laparoscopia pero 62 de ellas tenían evidencia de enfermedad pélvica.

La concordancia entre la permeabilidad tubárica documentada a través de estudios no invasivos y la laparoscopia, no justifica su uso de rutina, solamente para confirmar la permeabilidad tubárica. Pero esta totalmente justificada en histerosalpingografías anormales, sospecha de endometriosis o de adherencias pélvicas.

Cuando una mujer estéril con histerosalpingografía normal presenta a la laparoscopia enfermedad pélvica, habitualmente son adherencias pélvicas, aglutinación de fimbrias o endometriosis.

En las mujeres estériles con histerosalpingografía normal se ha encontrado una alta incidencia de adherencias pélvicas a la laparoscopia, Swart y cols. (12) en un meta análisis en el cual comparaban los resultados de trece estudios, en relación con adherencias peritubáricas encontraron que la histerosalpingografía es un pobre predictor de adherencias.

Las salpingolisis, ovariolisis y salpingoovariolisis son procedimientos quirúrgicos habituales que se llevan a cabo al transformar una laparoscopia diagnóstica en quirúrgica cuando encontramos adherencias, Gomel (13) publicó un estudio en 92 pacientes a las que se les efectuó salpingoovariolisis por laparoscopia, el 62% de las pacientes presentó gestación intrauterina y el 5.4% un embarazo ectópico. Estudios posteriores, diferentes autores, (14, 15, 16) dan similares resultados empleando técnicas diferentes (tijeras, electrocauterio o láser CO₂).

La aglutinación de las fimbrias interfiere en la captación del óvulo por la trompa, la enfermedad inflamatoria pélvica es la causa más frecuente de la presencia de esta patología, la solución endoscópica de esta alteración tubárica es la fimbrioplastia que se define como la lisis de adherencias en las fimbrias o la dilatación de la fimosis fimbriar. Las tasas de gestación en las fimbrioplastias por laparoscopia esta en-

tre 35%-39.6% según diversos autores (8, 14, 16) con embarazos ectópicos entre 9.7% y 12.3%, esta alta tasa de ectópicos es debido a que la enfermedad inflamatoria pélvica compromete en la mayoría de los casos todo el endosalpinx.

En las endometriosis existen estudios controlados y randomizados, en los cuales se compara el tratamiento quirúrgico laparoscópico, ablación de los focos endometriósicos y liberación de adherencias con tratamiento expectante (17, 18).

El trabajo de Marcoux y cols. estudia 341 mujeres estériles entre 20 y 29 años con endometriosis mínima y leve, un grupo de ellas fue tratado con ablación laparoscópica y a otras se les indicó tratamiento expectante, fueron estudiadas por 36 semanas. Los resultados demostraron que de 172 pacientes con ablación laparoscópica 50 gestaron (30.7%), comparado con 29 embarazos de las 169 pacientes con tratamiento expectante (17.7%).

El estudio de Parazzini con 96 pacientes estériles con endometriosis mínima y leve, fueron separadas al azar a 51 se les practicó ablación laparoscópica y a 45 solamente laparoscopia diagnóstica, fueron estudiadas por 52 semanas. De las 51 pacientes a las que se les practicó la ablación de los focos endometriósicos 12 gestaron (24%) y del grupo con tratamiento expectante 13 concibieron (29%).

En los estadios severos de la endometriosis su influencia negativa sobre la fertilidad podría ser explicada por el daño ocurrido en la motilidad tubárica y por las alteraciones anatómicas que dificultan la captación del óvulo.

Costoya y cols. (19) hacen un análisis retrospectivo del tratamiento quirúrgico de la endometriosis en relación con la esterilidad, comparando los diferentes estadios de la enfermedad, la edad de la paciente, la influencia de factores de esterilidad agregados y las terapias de hiperestimulación ovárica controlada con o sin inseminación intrauterina.

Se estudiaron 291 pacientes, 198 con endometriosis estadio mínimo y leve y 93 con estadio moderado y severo.

La primera conclusión al analizar el grupo con cirugía laparoscópica exclusiva es que la probabilidad de concepción acumulada a los 6 – 12 – 18 y 24 meses no dependió de la gravedad de la enfermedad. Esto significa que el estadio de la endometriosis de acuerdo a la clasificación AFS revisada de 1985 (20) es buena para la clasificación de la enfermedad y su control posterior pero no tiene valor pronóstico, en cuanto a la probabilidad de embarazo.

El concepto de la influencia de la edad en la calidad ovocitaria es un hecho plenamente aceptado, pero

en el estudio chileno no se encontró diferencias en relación a la gestación entre el grupo de mujeres mayores de 35 años y las menores de 35 años.

Finalmente en el análisis de las 248 pacientes tratadas con cirugía laparoscópica, agrupadas en estadios mínimo y leve y moderado y severo y que se distribuyeron en forma similar en dos subgrupos, uno sin tratamiento asociado y otro tratado con hiperestimulación ovárica controlada más inseminación intrauterina o solamente con hiperestimulación ovárica controlada no encontrándose diferencias en las posibilidades de concepción, así como tampoco en cuanto a las medias del tiempo transcurrido entre la laparoscopia y el embarazo.

En general podríamos concluir que la laparoscopia diagnóstica tiene gran utilidad en los casos de una histerosalpingografía anormal, sospecha de endometriosis o de adherencias pélvicas. Igualmente en los casos de una esterilidad de origen desconocido.

Cuando ya se ha decidido una técnica de reproducción asistida de alta complejidad no es justificable una laparoscopia.

BIBLIOGRAFÍA

- American Fertility Society.** Investigation of the infertile couple. American Fertility Society. Birmingham, AL, USA 1992.
- Oei SG, Helmerhorst FM, Bloemenkamp KWM y colb.** Effectiveness of the post coital test: randomized controlled trial. *Br Med J* 1998; 317:502-505.
- Balash J, Fábregues F, Creus M y colb.** The usefulness of endometrial biopsy for luteal phase evaluation in infertility. *Hum Reprod* 1992; 7: 973-977.
- Collins JA.** A couple with infertility. *JAMA* 1995; 247: 1159-1164.
- Speroff L, Glass RH, Kase NG,** Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 5th. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
- Ory SJ.** New options for diagnosis and treatment of ectopic pregnancy. *JAMA* 1992; 267:534-537.
- Ascenzo Cabello J.** Factor tubarico. *Fertilidad Matrimonial* 1972;63-71.
- Vergara C. Estudio comparativo entre la histerosalpingografía, histerosonografía y laparoscopia. Trabajo de incorporación a la Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología. 2001.
- Saavedra J.** Papel de la laparoscopia diagnóstica en la evaluación de la infertilidad femenina. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología.* 2004; Vol. 55 N° 1:71-82.
- Opsahl MS, Miller B, Klein TA.** The predictive value of histerosalpingography for tubal and peritoneal factors. *Fertil Steril* 1993; 60:444-448.
- El-Yahia AW.** Laparoscopic evaluation of apparently normal infertile women. *Aust NZJ Obstet Gynaecol* 1994; 34: 440-442.
- Swart P, Mol BW, van der Veen F, van Beurden M, Redenkop WK, Bossuyt PM.** The accuracy of histerosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a meta analysis. *Fertil Steril* 1995; 64: 486-491.
- Gomel V.** Salpingo-ovariolysis by laparoscopy in infertility. *Fertil Steril* 1983; 40: 607-611.
- Fayez JA.** An assessment of the role of operative laparoscopy in tuboplasty. *Fertil Steril* 1983; 39: 476-479.
- Marana R, Rizzi M, Muzzi L, Catalano GF, Caruana P, Mancuso S.** Correlation between the American Fertility Society classification of adnexal adhesions and distal tubal occlusion, salpingoscopy and reproductive outcome in tubal surgery. *Fertil Steril* 1995; 64: 924-929.
- Dubuisson JB, Bouquet de Jolienere J, Aubriot FX, Darai E, Foulot H, Mandelbrot L.** Terminal tuboplasties by laparoscopy: 65 consecutive cases. *Fertil Steril* 1995; 64: 924-929.
- Marcoux S, Maheus R, Berube S.** Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. *N. Engl J Med* 1997; 337: 217-222.
- Parazzini F.** Ablation of lesions or no treatment in minimal or mild endometriosis in infertile woman: a randomized trial. *Human Reprod* 1999; 14: 1332-1334.
- Costoya A, Manzur A, Miranda C, Dujoune S, Montes E.** Cirugía laparoscópica en la infertilidad asociada a endometriosis: ¿Que esperar en dos años? Trabajo colaborativo en Chile. *Reproducción Humana* 2002; Vol. 2 N° 3 5- 20.
- The American Fertility Society.** Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985. *Fertil Steril* 1985; 43: 351-352.

Hiperandrogenismo, resistencia a la insulina y síndrome de ovario poliquístico

Carlos Morán

Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Financiado parcialmente con los donativos 2004/149 y 2005/092 del IMSS.

Resumen

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un trastorno endocrino y metabólico, de probable origen genético, pero influenciado por factores ambientales. El SOP afecta aproximadamente al 6% en las mujeres en edad reproductiva. Los criterios para el diagnóstico del SOP incluyen anovulación, hiperandrogenismo y poliquistosis ovárica. La etiología del SOP es desconocida, pero se encuentran alteraciones neuroendocrinas, caracterizadas por disfunción gonadotrópica, y anomalías metabólicas, determinadas por resistencia a la insulina. El tratamiento del SOP debe ser integral, teniendo en cuenta las alteraciones metabólicas y los motivos específicos de consulta de la paciente. El pronóstico para la fertilidad y para el control de los síntomas es favorable en la mayoría de las pacientes con SOP; sin embargo, deben tener seguimiento a largo plazo para evitar en lo posible el desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas.

Palabras clave: Síndrome de ovario poliquístico. Hiperandrogenismo. Hirsutismo. Resistencia a la insulina.

Summary

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrine and metabolic disorder, probably of genetic origin but affected by environmental factors. PCOS affects approximately 6% of women at reproductive age. The criteria for PCOS diagnosis include anovulation, hyperandrogenism and polycystic ovaries. The etiology of PCOS is unknown, but there are neuroendocrine alterations, characterized by gonadotropic dysfunction, and metabolic alterations manifested by insulin resistance. The treatment of PCOS must be integral, taking into account the metabolic alterations, along with the specific complaints of patients. The prognosis for most of PCOS patients is successful with respect to solve infertility and to control symptoms; however, long term follow-up is necessary in order to avoid as far as possible chronic metabolic illnesses.

Key words: Polycystic ovary syndrome. Hyperandrogenism. Hirsutism. Insulin resistance.

Correspondencia: Dr. Carlos Morán
413 Interamerica Blvd. WH1, PMB 67-139
Laredo, Texas, USA
Correo electrónico: cemoranv@hotmail.com

DEFINICIÓN Y PREVALENCIA

El SOP es un trastorno heterogéneo, con alteraciones endocrinas y metabólicas, de probable origen genético, pero influenciado por factores ambientales, como la nutrición y la actividad física. Las principales características clínicas del SOP se relacionan con el hiperandrogenismo, como hirsutismo, acné y trastorno menstrual (1, 2). El SOP se asocia con obesidad, principalmente del segmento superior (3, 4) y anomalías metabólicas como resistencia a la insulina (5-7), constituyéndose en un factor de riesgo para el desarrollo de intolerancia a los carbohidratos y diabetes mellitus tipo 2 (8, 9).

El SOP afecta del 3% al 7% de las mujeres en edad reproductiva en diferentes poblaciones (10-12), por lo que se considera el trastorno endocrino más frecuente de la mujer en edad reproductiva. Además, el SOP se encuentra en el 70-80% de las mujeres con hiperandrogenismo (1, 2).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Los criterios actuales para el diagnóstico del SOP son: 1) oligoovulación o anovulación, 2) hiperandrogenismo clínico o bioquímico, y 3) ovarios poliquísticos. Se ha acordado por consenso que para el diagnóstico se requieren dos de los tres criterios mencionados (13). Por lo tanto, si bien el SOP típico cursa con los tres criterios presentes, también se puede diagnosticar con sólo dos de ellos: anovulación e hiperandrogenismo, en presencia de ovarios normales; anovulación y poliquistosis ovárica, sin hiperandrogenismo; hiperandrogenismo y ovarios poliquísticos, con ciclos menstruales ovulatorios.

Los criterios diagnósticos actuales del SOP (13) indican que se deben descartar otros trastornos endocrinos como la hiperplasia suprarrenal congénita, principalmente la deficiencia no clásica (tardía) de 21-hidroxilasa, la presencia de tumores productores de andrógenos, la hiperprolactinemia, el hipotiroidismo, el síndrome de Cushing, y el síndrome compuesto por hiperandrogenismo-resistencia a la insulina-acantosis nigricans (HAIRAN) (1, 2, 4).

ANOVULACIÓN Y OLIGOOVULACIÓN

En el SOP la anovulación se manifiesta por ciclos menstruales irregulares, generalmente más largos o incluso amenorrea. Actualmente se describe que el SOP puede cursar también con oligoovulación, la

cual consiste en la presentación de ciclos menstruales irregulares con ovulación eventual (2, 13). Esto explica algunos casos de pacientes con SOP que consiguen embarazo sin tratamiento.

HIPERANDROGENISMO CLÍNICO E HIPERANDROGENEMIA

El hiperandrogenismo puede manifestarse clínicamente por hirsutismo (1, 2, 4, 14) y acné (2, 15), o puede demostrarse por hiperandrogenemia (2, 4). Es raro encontrar casos de SOP con virilización (clítoromegalia, voz grave, alopecia o recesos temporales), y cuando esto sucede es recomendable descartar algún otro problema de hiperandrogenismo (1, 2, 4, 16).

La hiperandrogenemia se refiere al aumento de uno o varios andrógenos circulantes, como testosterona (T) total o libre, androstendiona (A), dehidroepiandrosterona (DHEA) o sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS). La hiperandrogenemia generalmente se encuentra en 60-80% de las pacientes y la T libre es el andrógeno que más frecuentemente está aumentado, aproximadamente en 50-60% de las pacientes con SOP (2, 4).

POLIQUISTOSIS OVÁRICA

La presencia de ovarios poliquísticos se determina actualmente por ultrasonido, aunque también es posible hacerlo por otros métodos diagnósticos. Se ha propuesto como imagen característica de la poliquistosis ovárica, a la presencia de más de doce quistes menores de 10 mm en la periferia de uno o ambos ovarios, y aumento del volumen ovárico mayor de 10 mm³ (13, 17); sin embargo, no se han validado perfectamente los criterios morfológicos característicos de la poliquistosis ovárica.

DISFUNCIÓN GONADOTRÓPICA

La etiología del SOP es desconocida. La alteración hipotalámica parece consistir en un incremento en la frecuencia de los pulsos de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), lo cual genera una mayor liberación de LH pero no de FSH, dando por resultado una disociación en la relación de LH/FSH, en una proporción mayor a dos (18). Sin embargo, la disociación basal de LH/FSH no siempre se puede demostrar en una sola muestra de suero, ya que sólo se ha encontrado presente en 20-40% de las pacientes con SOP (1, 19).

La LH estimula en las células de la teca del ovario de las pacientes con SOP una producción mayor de A y T (20, 21). Existe controversia sobre el efecto de la obesidad en las concentraciones de andrógenos en el SOP (22, 23). Sin embargo, se encuentra una disminución en la síntesis de globulina transportadora de esteroides sexuales, y consecuentemente un aumento en los andrógenos libres (23). Un 20-25% de las pacientes con SOP presentan hiperandrogenemia de origen suprarrenal demostrada por mayor concentración de DHEAS (24).

RESISTENCIA A LA INSULINA

La resistencia a la insulina se ha encontrado en 50-75% de las mujeres con SOP, dependiendo de la sensibilidad del método de detección utilizado (4, 19, 25). La resistencia a la insulina se presenta en mujeres con SOP tanto con peso adecuado, como con sobrepeso u obesidad, pero es de mayor magnitud cuando hay obesidad (7, 19, 26-28). Existen varios métodos para determinar la resistencia a la insulina (29) y entre los más sencillos están los realizados en una sola toma basal, como el índice glucosa (mg/dL)/insulina (μ U/mL), en el cual un valor menor de 4,5 se considera como indicativo de resistencia a la insulina (30); sin embargo, su sensibilidad es baja, detectando resistencia a la insulina en aproximadamente 50% de las pacientes con SOP (4, 19). Se han informado alteraciones en la interacción de la insulina y su receptor en diversos tejidos, caracterizadas por disminución en la autofosforilación de tirosina e incremento en la de serina, en el receptor de insulina (31-33).

La insulina estimula en forma sinérgica con la LH la producción de andrógenos por las células ováricas (34) y la hiperinsulinemia condiciona mayor producción de andrógenos en mujeres con hiperandrogenismo (5, 35). Los dos principales componentes fisiopatológicos del SOP, el exceso de LH producto de la disfunción gonadotrópica y la hiperinsulinemia resultante de la resistencia a la insulina, interaccionan en su funcionamiento (19) y ambos procesos generan hiperandrogenemia (36, 37).

ORIGEN GENÉTICO

El origen genético se fundamenta en la observación de que el SOP es más frecuente entre las hermanas y madres de estas pacientes (38, 39). Además, por los estudios en gemelas, donde se observa mayor co-

rrelación en la presencia de SOP en las monocigóticas que en las dicigóticas (40). En la búsqueda del origen genético del SOP se han evaluado múltiples genes relacionados con la producción de andrógenos, con la función de las gonadotropinas, con la acción de la insulina y la regulación de energía (41). Sin embargo, aunque se han encontrado asociaciones de algunos genes, incluso de regiones específicas y determinados polimorfismos, con los trastornos clínicos del SOP, los hallazgos no han sido consistentes en diferentes estudios y en distintas poblaciones (41-43).

TRATAMIENTO METABÓLICO

Se debe considerar una estrategia de manejo del problema metabólico general del SOP, el cual incluye cambios en el estilo de vida relacionados con la nutrición y la actividad física. Se ha observado que algunas pacientes con SOP pueden presentar ciclos menstruales y ovulación al reducir más del 5% de su peso corporal (44). Por lo tanto, la reducción o al menos el mantenimiento del peso debe ser la base del tratamiento. Se recomienda el uso temporal de los sensibilizantes a la insulina como la metformina (1000-1500 mg por día), como coadyuvantes de la dieta y el ejercicio para controlar los aspectos metabólicos del SOP, principalmente la resistencia a la insulina (45), pero se desconoce la duración más adecuada para este tratamiento. Dado que el SOP es un trastorno endocrino y metabólico, el tratamiento debe planearse a largo plazo, principalmente en las adolescentes, quienes pueden beneficiarse más oportunamente, antes de que los signos y síntomas sean excesivos y difíciles de manejar.

MANEJO DEL HIPERANDROGENISMO

Si la paciente con SOP consulta por hirsutismo o acné, se pueden utilizar antiandrógenos, o mezclas de antiandrógeno y estrógeno (1, 2, 46). Los antiandrógenos más utilizados son la ciproterona, la drospirenona y la espironolactona. La ciproterona (2 mg) y la drospirenona (3 mg) se administran en combinación con etinilestradiol (0.035 ó 0.030 mg, respectivamente), en ciclos de 21 días de tratamiento por siete de descanso. La ciproterona también se puede administrar a mayores dosis (hasta 50 mg) durante 10-14 días, en forma complementaria a la mezcla mencionada de antiandrógeno y etinilestradiol (47, 48). Con estos tratamientos se consigue disminución del hirsutismo en aproximadamente 60-70% de las pacientes (1, 46,

47), y mejoría del acné en alrededor del 90% de los casos (47). La ciproterona tiene mayor poder antiandrogénico que la drospirenona, pero esta tiene la ventaja de evitar la retención de líquidos por su efecto antiminerlocorticoide (49). La espironolactona (100-200 mg por día) puede administrarse para el tratamiento del hirsutismo, ya sea sola o acompañada por un compuesto hormonal de estrógeno y progestágeno, logrando una mejoría del hirsutismo y acné hasta en 80% de las pacientes (2). Los antiandrógenos se deben administrar alrededor de nueve meses para lograr disminuir significativamente el hirsutismo y acné (47), pero los síntomas tienden a reaparecer al suspender el tratamiento (48). El uso de la electrolisis complementaria al tratamiento con antiandrógenos mejora los resultados estéticos en el caso del hirsutismo (2).

ABORDAJE DEL TRASTORNO MENSTRUAL

En la amenorrea o el trastorno menstrual se puede indicar una mezcla de estrógeno y progestágeno con escasa acción androgénica (como la medroxiprogesterona), o de estrógeno y antiandrógeno (1, 2). Estas combinaciones hormonales se administran en forma cíclica durante 21 días por siete de descanso, y la mayor parte de ellas tienen efecto anticonceptivo. También se puede administrar sólo un progestágeno, como medroxiprogesterona (5-10 mg por día), cíclicamente durante 12-14 días cada mes, para evitar la hiperplasia de endometrio por la acción persistente de los estrógenos (50).

INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN

Para el trastorno de la fertilidad por anovulación, el clomifeno (50-150 mg) durante 5 días, a dosis crecientes, es el medicamento de elección por su efectividad, gran experiencia en su uso, facilidad de administración y bajo costo (51, 52). Otra forma para inducir la ovulación es la administración de metformina (1000-1500 mg por día) (45). Sin embargo, existe controversia sobre el uso inicial de metformina en lugar de clomifeno, o incluso sobre el uso combinado de ambos fármacos, principalmente en las pacientes con sobrepeso u obesidad, quienes presentan más resistencia a la insulina (53). Se debe recordar que la metformina en raros casos puede producir acidosis láctica, motivo por el cual es necesario evaluar la función renal antes y periódicamente durante su

administración. También se ha propuesto el uso de metformina durante los tres primeros meses del embarazo para disminuir el riesgo de aborto (54), pero se necesitan más estudios de investigación a este respecto. En las pacientes que no responden a la inducción de la ovulación con clomifeno y metformina se puede pasar al estímulo con gonadotropinas, especialmente FSH pura o recombinante (50, 52, 53, 55). Existen algunos estudios que indican resultados satisfactorios con los inhibidores de aromataza, con la ventaja de disminuir la incidencia de embarazos múltiples (56), pero falta más investigación sobre su efectividad. Se ha retomado el tratamiento quirúrgico con la realización de perforaciones ováricas con diatermia o láser, para la inducción de la ovulación en pacientes refractarias a los tratamientos farmacológicos con inductores de la ovulación, encontrando una menor proporción de embarazos múltiples (50, 57). Sin embargo, falta más investigación sobre los efectos de estos procedimientos a largo plazo.

PRONÓSTICO PARA LA FERTILIDAD Y SECUELAS METABÓLICAS

Las pacientes con SOP tienen un pronóstico favorable para la fertilidad. En estudios de seguimiento a largo plazo (30 años) se ha observado que 17-24% de las pacientes con SOP definitivamente no logra conseguir el embarazo, en comparación al 1-16% de las mujeres controles (58, 59).

Se debe recordar que las pacientes con SOP tienen más riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como intolerancia a los carbohidratos y diabetes mellitus tipo 2 (8, 9), enfermedad cardiovascular (59-61), hipertensión arterial (58, 59), hiperlipidemia (59, 61), alteración hepática (62) y cáncer de endometrio (59). Por todos estos riesgos, las pacientes con SOP deben seguirse a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Morán C, Tapia MC, Hernández E, Vázquez G, García Hernández E, Bermúdez JA.:** Etiological review of hirsutism in 250 patients. Arch Med Res 1994; 25: 311-314.
2. **Azziz R, Sánchez LA, Knochenhauer ES, Morán C, Lazenby J, Stephens KC, Taylor K, Boots LR.:** Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 453-462.
3. **Morán C, Hernández E, Ruiz JE, Fonseca ME,**

- Bermúdez JA, Zarate A.: Upper body obesity and hyperinsulinemia are associated with anovulation. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 47: 1-5.
4. **Romaguera J, Moran C, Díaz-Montes TP, Hines GA, Cruz RI, Azziz R.:** Prevalence of 21-hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia and insulin resistance among hirsute women from Puerto Rico. *Fertil Steril* 2000; 74: 59-62.
 5. **Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE.:** Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 113-116.
 6. **Matteini M, Cortozzi G, Bufalini GN, Relli P, Lazzari T.:** Hyperinsulinism and insulin resistance in the polycystic ovary syndrome as tested with tolbutamide. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1982; 58: 1455-1460.
 7. **Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL, Kaplan SA.:** Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 356-359.
 8. **Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A.:** Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 165-169.
 9. **Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J.:** Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 1999; 22: 141-146.
 10. **Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R.:** Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States. A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3078-3082.
 11. **Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, Zapanti ED, Bartzis MI.:** A Survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4006-4011.
 12. **Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF.:** A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2434-2438.
 13. **The Rotterdam ESHRE/SARM-Sponsored. PCOS Concensus Workshop Group.:** Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004; 81: 19-25.
 14. **Hines G, Moran C, Huerta R, Folgman K, Azziz R.:** Facial and abdominal hair growth in hirsutism: a computerized evaluation. *J Acad Dermatol* 2001; 45: 846-850.
 15. **Slyden SM, Moran C, Sams WM, Boots LR, Azziz R.:** Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril* 2001; 75: 889-892.
 16. **Moran C, Azziz R.:** 21-Hydroxylase-deficient non-classic adrenal hyperplasia: the great pretender. *Sem Reprod Med* 2003; 21: 295-300.
 17. **Pache TD, Wladimiroff JW, Hop WCJ, Fauser BCJM.:** How to discriminate between normal and polycystic ovaries: transvaginal US study. *Radiology* 1992; 183: 421-423.
 18. **Yen SSC, Vela P, Rankin J.:** Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol* 1970; 30: 435-442.
 19. **Moran C, García-Hernández E, Barahona E, González S, Bermúdez JA.:** Relationship between insulin resistance and gonadotropin dissociation in obese and nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; 80: 1466-1472.
 20. **Horton R, Neisler J.:** Plasma androgens in patients with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocr* 1968; 28: 479-484.
 21. **Rosenfield RL, Ehrlich EN, Cleary RE.:** Adrenal and ovarian contributions to the elevated free plasma androgen levels in hirsute women. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34: 92-98.
 22. **Dunaif A, Mandeli J, Fluhr H, Dobrjansky A.:** The impact of obesity and chronic hyperinsulinemia on gonadotropin release and gonadal steroid secretion in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 131-139.
 23. **Holte J, Bergh T, Berne C, Lithell H.:** Serum lipoprotein lipid profile in women with the polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric, endocrine and metabolic variables. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 463-471.
 24. **Moran C, Knochenhauer ES, Boots LR, Azziz R.:** Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: relation to age and body mass. *Fertil Steril* 1999; 71: 671-674.
 25. **Carmina E, Koyama T, Chang L, Stanczyk FZ, Lobo RA.:** Does ethnicity influence the prevalence of adrenal hyperandrogenism and insulin resistance in polycystic ovary syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167: 1807-1812.
 26. **Shoupe D, Kumar DD, Lobo RA.:** Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 588-592.
 27. **Pasquali R, Casimiri F, Venturoli S, Paradisi R, Mattiolo R, Capelli M, Melchionda N, Labo G.:** Insulin resistance in patients with polycystic ovaries: its relationship to body weight and androgen levels. *Acta Endocrinol* 1983; 104: 110-116.

28. **Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A.:** Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38: 1165-1174.
29. **Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP.:** Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59: 141-154.
30. **Legro RS, Finegood D, Dunaif A.:** A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2694-2698.
31. **Ciaraldi TP, El-Roeiy A, Madar Z, Reichart D, Olefsky JM, Yen SSC.:** Cellular mechanism of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 577-583.
32. **Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z.:** Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995; 96: 801-810.
33. **Moran C, Huerta R, Conway-Myers BA, Hines GA, Azziz R.:** Altered autophosphorylation of the insulin receptor in the ovary of a woman with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 75: 625-628.
34. **Nagamani M, Stuart CA, Van Dinh T.:** Steroid biosynthesis in the Sertoli-Leydig cell tumor: Effects of insulin and luteinizing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1738-1743.
35. **Stuart CA, Prince MJ, Peters EJ, Meyer III WJ.:** Hyperinsulinemia and hyperandrogenemia: in vivo androgen response to insulin infusion. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 921-925.
36. **Dale PO, Tanbo T, Vaaler S, Abyholm T.:** Body weight, hyperinsulinemia, and gonadotropin levels in the polycystic ovarian syndrome: evidence of two distinct populations. *Fertil Steril* 1992; 58: 487-491.
37. **Fulghesu AM, Cucinelli F, Pavone V, Murgia F, Guido M, Caruso A, Mancuso S, Lanzone A.:** Changes in luteinizing hormone and insulin secretion in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 1999; 14: 611-617.
38. **Lunde O, Magnus P, Sandvik L, Hoglo S.:** Familial clustering in the polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Obstet Invest* 1989; 28: 23-30.
39. **Govind A, Obhrai MS, Clayton RN.:** Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 38-43.
40. **Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI.:** Heritability of polycystic ovary syndrome in Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 (en prensa).
41. **Urbaneck M, Legro RS, Driscoll D, Strauss JF, Dunaif A, Spielman RS.:** Searching for the polycystic ovary syndrome genes. *J Pediatric Endocrinol Metab* 2000; 13 (Suppl 5): 1311-1313.
42. **El Mkaem SA, Lautier C, Makari F, Molinari N, Lefebvre P, Renard E, Gris JC, Cros G, Daures JP, Bringer J, White MF, Grigorescu F.:** Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 2001; 50: 2164-2168.
43. **Urbaneck M, Woodroffe A, Ewens KG, Diamanti-Kandarakis E, Legro RS, Strauss JF, Dunaif A, Spielman RS.:** Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6623-6629.
44. **Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, Franks S.:** Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 1992; 36: 105-111.
45. **Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ.:** Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994; 43: 647-654.
46. **Venturoli S, Marescalchi O, Colombo FM, Macrelli S, Ravaioli B, Bagnoli A, Paradisi R, Flamigni C.:** A prospective randomized trial comparing low dose flutamide, finasteride, ketokonazole, and cyproterone acetate-estrogen regimens in the treatment of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1304-1310.
47. **Hammerstein J, Moltz L, Schwartz U.:** Antiandrogens in the treatment of acne and hirsutism. *J Steroid Biochem* 1983; 19: 591-597.
48. **Yucelten D, Erenus M, Gurbuz O, Durmusoglu F.:** Recurrence rate of hirsutism after 3 different antiandrogen therapies. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 64-68.
49. **Muhn P, Krattenmacher R, Beier S, Elger W, Schillinger E.:** Drospirenone: a novel progestogen with antiminerlocorticoid and antiandrogenic activity. *Contraception* 1995; 51: 99-110.
50. **Loy R, Seibel MM.:** Evaluation and therapy of polycystic ovarian syndrome. *Endocrinol Metab Clin NA* 1988; 17: 785-813.
51. **Zarate A, Hernández-Ayup S, Rios-Montiel A.:** Treatment of anovulation in the Stein-Leventhal syndrome. Analysis of 90 cases. *Fertil Steril* 1971; 22: 188-193.
52. **Stadtmauer L, Oehninger S.:** Management of infertility in women with polycystic ovary syndrome: a practical guide. *Treat Endocrinol* 2005; 4: 279-292.

53. **Nestler JE, Stovall D, Akhter N, Iuorno MJ, Jakubowicz DJ.:** Strategies for the use of insulin-sensitizing drugs to treat infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002; 77: 209-215.
54. **Glueck CJ, Phillips H, Cameron D, Sieve-Smith L, Wang P.:** Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first trimester spontaneous abortion: a pilot study. *Fertil Steril* 2001; 75: 46-52.
55. **Moran C, Romero ML, Hernández T, Merino G, Bermúdez JA.:** Ovulation induction with FSH in polycystic ovarian syndrome without clomiphene citrate response. *ARTA* 1997; 9: 59-63.
56. **Casper RF, Mitwally MF.:** Review: aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 760-771.
57. **Farquhar C, Lilford RJ, Marjoribanks J, Vandekerckhove P.:** Laparoscopic "drilling" by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 3: CD001122.
58. **Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F, Oden A, Janson PO, Mattson LA, Crona N, Lundberg PA.:** Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertil Steril* 1992; 57: 505-513.
59. **Wild S, Pierpoint T, Jacobs H, McKeigue P.:** Long-term consequences of polycystic ovary syndrome: results of a 31 year follow-up study. *Hum Fertil* 2000; 3: 101-105.
60. **Wild RA, Grubb B, Hartz A, Van Nort JJ, Bachman W, Bartholomew M.:** Clinical signs of androgen excess as risk factors for coronary artery disease. *Fertil Steril* 1990; 54: 255-259.
61. **Talbott E, Clerici A, Berga SL, Kuller L, Guzick D, Detre K, Daniels T, Engberg RA.:** Adverse lipid and coronary heart disease risk profiles in young women with polycystic ovary syndrome: results of a case-control study. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 415-422.
62. **Schwimmer JB, Khorram O, Chiu V, Schwimmer WB.:** Abnormal aminotransferase activity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2005; 83: 494-497.

Conducta reproductiva ante el semen potencialmente infeccioso

Jose Antonio Castilla, Mari Carmen Gonzalvo, Ana Clavero, Antonio Garrido, Maria Sánchez, Maria Hernández, Sonia Calderón, Ana Sánchez.

U. Reproducción, HU "Virgen de las Nieves". Granada

En una primera aproximación, bajo el epígrafe "potencialmente infeccioso" se incluirían a los sémenes procedentes de varones con enfermedades infecciosas transmisibles (EIT) (VIH, hepatitis B y C, sífilis) y aquellos especímenes seminales procedentes de varones sin estudio serológico de estas enfermedades. Sin embargo, aunque se realizaran a todos los varones de parejas estériles estudios serológicos no se identificarían a todos los pacientes infectados ya que no serían detectados (periodo ventana) aquellos que todavía no hubieran seroconvertido. Ante la imposibilidad de identificar, en el campo sanitario en general, de manera fiable a todos los pacientes infectados, el Centro de Control de Enfermedades (Center for Disease Control: CDC) de Atlanta (EEUU) consideró en 1987 que sería conveniente adoptar con todos los pacientes las denominadas "Precauciones Universales", al manejar la sangre y determinados fluidos orgánicos, entre los que se incluye el semen.

En base a esto, la sangre, fluidos contaminados con sangre y los fluidos corporales de todos los pacientes se consideran potencialmente infecciosos para el VIH, VHB, VHC y otros patógenos transmitidos por la sangre. Posteriormente, se publicaron las medidas de precaución estándar (1996), constituyendo los principios de prevención primaria de las infecciones transmitidas por fluidos orgánicos, y que comentaremos posteriormente brevemente. Antes intentemos aclarar algunas cuestiones que repercuten directamente en el manejo de este tipo de muestras (CDC, 2001).

¿PUEDEN REALIZARSE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA A VARONES CON EIT?

Gracias a los trabajos pioneros en nuestro país de Marina et al (1998), actualmente está ampliamente

aceptado a nivel nacional e internacional la necesidad de aplicar técnicas de reproducción asistida a parejas cuyos varones padecen alguna enfermedad infecciosa transmisible, con el objeto de reducir al máximo las posibilidades de contagio en la pareja y por ende la transmisión de la enfermedad al niño. De hecho dicha actividad está incluida en la cartera de servicios de las Conserjerías de Salud de varias comunidades autónomas, e incluida en el listado B del Anexo I del Real Decreto que regula los procedimientos del fondo de cohesión sanitaria (Real Decreto 1247/2002, de 3 de diciembre).

La publicación de la Directiva 2006/17/CE de la comisión europea de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos, establece en el anexo III punto 2.6 que "un resultado positivo (en las pruebas serológicas) no necesariamente impedirá la utilización por la pareja de las células reproductoras, en función de la legislación nacional".

Hoy día la discusión se centra más en el manejo clínico de estos varones, en las medidas a tomar para evitar la transmisión de la enfermedad no solo a la pareja o el embrión, sino también al personal sanitario que maneja dicha muestra o la transmisión a otras parejas incluidas en el mismo programa de reproducción asistida.

¿ES NECESARIO INCLUIR EN LOS PROGRAMAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA A TODOS LOS VARONES CON EIT?

En la práctica clínica diaria es frecuente encontrarse parejas con varón VIH+ que han decidido tener descendencia mediante relaciones naturales, habiéndose

dose estimado que aproximadamente el 25-40% de estas parejas pueden llegar a tener relaciones sin protección con deseos reproductivos (Klein et al., 2003). Basados en esta realidad y en datos previos que demostraban que la transmisión heterosexual dependía de la carga viral en sangre periférica, siendo nula por debajo de 1500 copias/mL (Quinn et al., 2000), algunos grupos han comenzado a plantear estudios en parejas con varón VIH+ con deseos reproductivos mediante relaciones naturales. En España, en 40 parejas con varones con anticuerpos antiVIH+, en tratamiento con terapia antiretroviral potente y menos de 50 copias ARN-VIH/mL al menos durante 6 meses se han conseguido más de 50 gestaciones sin seroconversiones, manteniendo relaciones solo en días alternativos próximos a la ovulación (Barreiro et al., 2006a). Estos resultados deben ser tomados con cautela y esperar a estudios más extensos antes de generalizar dicha práctica, tal como los propios autores recomiendan (Barreiro et al., 2006b).

En contradicción con esta postura estarían hallazgos como los de Dornadula et al., (1999) los cuales detectan la presencia de VIH en semen de varones con anticuerpos anti VIH con menos de 50 copias/mL en suero, y que hablan de que en el aparato genital, al igual que en el sistema nervioso central, distintos factores locales pueden afectar a la infección por VIH. Entre estos factores estarían la co-infección con otros patógenos de transmisión sexual que pueden provocar condiciones inflamatorias que conlleven una mayor replicación del VIH (p. ej. Citomegalovirus) (Speck et al., 1999; Xu et al., 2005) o que algunos antiretrovirales no puedan alcanzar determinadas regiones del tracto genital masculino (Solas et al., 2003).

No obstante, si nos basamos en criterios de medicina basada en la evidencia, y utilizamos el estadístico NNT (número de pacientes que se necesita tratar para prevenir un efecto adverso) y tenemos en cuenta que el riesgo de transmisión sexual de VIH de varón a mujer por coito en parejas estables es de 0.001 (Gray et al., 2001) y que en parejas con baja carga viral este riesgo se reduce (0.0001; Gray et al., 2001), y que las parejas que van a ser tratadas con técnicas de reproducción asistida serán aquellas de baja o nula carga viral, es fácil comprobar que para demostrar que el riesgo de contaminación utilizando lavado seminal es menor que con relaciones naturales se necesitan estudiar 3000 casos, y para un riesgo de 0.0001 se necesitaría 30.000 casos (Englert et al., 2004). Cifras muy lejanas de los casos publicados actualmente. Por lo que podemos concluir que no existe evidencia científica de calidad que demuestre la utili-

dad del lavado seminal, y que tardaremos mucho tiempo en obtenerla (Englert et al., 2004).

La postura a tomar en cuanto a varones con anticuerpos anti-VHC no está clara pues existe una gran controversia sobre el papel de la transmisión sexual del VHC (Pérez-Millan, 2002). Existiendo autores que hablan de que no es motivo para incluir a estas parejas en programas de reproducción asistida (Steyaert et al., 2000) o que debería ser la pareja bien informada la que decidiera si someterse o no a reproducción asistida (ASRM, 2004). Lo que sí es evidente es que no es necesario la inclusión en programas de RA de varones con anticuerpos VHC si se demuestra: a) son falsos positivos, circunstancia no extraña en poblaciones donde la prevalencia es <10%, como es el caso de las parejas estériles, y donde hasta un 50% de los varones con anticuerpos antiVHC+ pueden ser falsos positivos (Esteban, 2004), o b) que se han curado de la infección, lo que ocurre entre 10-40% de los casos. Estas circunstancias se establecen cuando tras resultar positiva la presencia de anticuerpos a VHC obtenemos al menos 2 cargas virales negativas separadas unos meses, tal como recomiendan diferentes publicaciones (CDC, 2003; Esteban, 2004; British Columbia Health Service, 2004, Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria, 2004).

De igual manera aquellos varones portadores de Ag HBs no deben ser incluidos en programas de RA si su pareja presenta inmunidad frente al VHB teniendo anticuerpos antiHBS+. En caso contrario, <5% de las personas vacunadas no desarrollan dicha inmunidad, si será necesario incluirlos en un programa de RA con lavado seminal.

¿ES OBLIGATORIO LAVAR EL SEMEN O BASTA CON REALIZAR UNA DETERMINACIÓN VIRAL EN EL SEMEN Y SI ES NEGATIVA PROCEDER CON TRANQUILIDAD?

En el caso de VIH tanto la legislación francesa al respecto como la mayoría de autores analizan la presencia de virus en el semen preparado (Semprini et al., 2004; Marina et al., 1998; Bujan et al., 2004; Sauer et al., 2002; Ohl et al., 2003; Meseguer et al., 2002), sin embargo en casos de VHC la normativa francesa establece que si no se detecta VHC en el semen antes del lavado es suficiente y se puede realizar la TRA con tranquilidad. Sin embargo, otros trabajos publicados realizan la determinación en el semen lavado (Pasquier et al., 2000; Levy et al., 2002; Meseguer et al., 2002; Garrido et al., 2005).

¿ES NECESARIO REALIZAR DETECCIÓN DE VIRUS EN EL SEMEN PREPARADO A TODAS LAS PAREJAS CON EIT INCLUIDAS EN PROGRAMAS DE TRA?

Mencaglia et al (2005) describen la realización de ICSI a 25 parejas con varón seropositivo para HIV, 10 parejas con varón seropositivo HIV/HCV y 8 con varón seropositivo HCV, teniendo todos ellos en sangre periférica una carga viral < 50 copias de HIV y/o RNA-HCV por ml. En ningún caso se estudió en la muestra de semen preparada la presencia de VIH o VHC. No registrándose ninguna seroconversión y obteniéndose 22 embarazos.

Aunque de este trabajo pudiera concluirse que no es necesario realizar detección de virus en la muestra de semen preparado en varones con carga viral negativa en sangre periférica, es necesario comentar que estos autores, en una reciente carta al editor (Piomboni et al., 2006) reconocieron que su trabajo solo se realizó en un número pequeño de casos y que tras ese trabajo a todas las parejas con EIT les realizan detección de virus en la muestra de semen preparado. Aconsejando que se realice sistemáticamente dicha determinación, tal como recomiendan todos los autores.

De igual manera, se han publicado trabajos que han tratado a varones con anticuerpos VHC+ con TRA solo con lavado seminal sin detección posterior de virus en el lavado seminal (Pirwany et al., 2004), basados en trabajos previos que detectaban VHC en semen total, pero no tras preparación en gradientes de densidad (Levy et al., 2000). Sin embargo este proceder no parece lógico una vez demostrada por otros autores la presencia de VHC en semen tras preparación en gradientes de densidad (Levy et al., 2002; Garrido et al., 2005).

No debemos olvidar la alta variabilidad que presentan los niveles de VIH y VHC en semen en un mismo individuo (Gilliam et al., 1997; Coombs et al., 1998; Levy et al., 2002; Pasquier et al., 2003).

¿HAY ALGÚN PARÁMETRO QUE CONTRAINDIQUE EL LAVADO SEMINAL EN UN VARÓN CON EIT?

La opinión más extendida es la de aplicar estas técnicas a pacientes con infección estable y controlada, aunque tengan carga viral en sangre periférica positiva. Speck et al. (1999) analizaron que factores influían en la presencia de VIH en el semen y conclu-

yeron que se relacionaba con la presencia de leucocitos en el semen, la coinfección seminal con Citomegalovirus, niveles de CD4 en sangre periférica y no recibir tratamiento antiretroviral. Por lo que parece lógico no guiarse por la carga viral en sangre periférica como factor determinante. No obstante, existen posiciones diferentes a la comentada anteriormente. La Normativa Francesa sobre Seguridad Biológica en Laboratorios de Reproducción Asistida (1999) establece que no se intente el lavado seminal a ningún varón con una carga viral VIH en semen superior a 10.000 copias/mL, independientemente de su estado de salud.

En caso de infección por VHC tampoco existe una correlación clara entre carga viral en sangre periférica y presencia en semen. Además en casos de presencia de VHC en semen la concentración suele ser baja (<200 copias/mL) (Leruez-Ville et al., 2000). Discutiendo algunos autores si realmente es infectiva dicha concentración (Dore and Kaldor, 2000). En la práctica habitual, es habitual encontrarse pacientes con elevadas cargas virales que antes de recibir tratamiento, el cual (ribavirina) puede afectar su calidad seminal (Narayana et al., 2002), acuden para conservar su semen previo lavado seminal, resultando negativo dicho lavado. No obstante algunos autores han sugerido limitar la aplicación de TRA hasta que el varón no tenga en sangre periférica < de 1.000.000 copias/mL (Duffaut and Valla, 1997).

Otro elemento fundamental es la necesidad de que estas parejas estén comprometidas con los tratamientos indicados y tengan una buena adherencia a los mismos. Será necesario valorar el grado de compromiso de la pareja pues deben adquirir varios compromisos como realizarse los análisis que se indiquen quede o no gestante tras la TRA, utilizar preservativo en sus relaciones sexuales desde meses antes de la técnica de reproducción y no mantener relaciones sexuales en el mes anterior a la técnica de reproducción asistida. Estas últimas medidas serán necesarias para estar seguro del origen de las posibles seroconversiones tras la técnica de reproducción (Sauer and Choi, 2006).

¿QUÉ ES MÁS SEGURO IAC O ICSI?

En casos de VIH, ante un semen con suficiente calidad para realizar IAC la normativa francesa obliga a realizar ICSI si la carga viral en semen total es superior a >1000 copias/mL aunque el semen preparado sea negativo. No obstante, la mayoría de autores creen que la IAC es una técnica segura siempre y cuando

se haya comprobado la ausencia de virus en el semen lavado (Bujan et al., 2004; Marina et al., 1998).

¿QUÉ TÉCNICA DE DETECCIÓN DE VIRUS EMPLEAR?

La técnica más empleada, de más fácil acceso y que ha demostrado sobradamente ser eficiente es la utilización de kit comerciales. Estos no pueden excluir totalmente la presencia de virus en una muestra, ya que no lo detectan si su concentración en dicha muestra es menor que el límite de sensibilidad del kit. No obstante, no se ha descrito hasta la actualidad ningún caso de contagio ni en las mujeres tratadas con este tipo de semen ni en los recién nacidos obtenidos, lo que nos sugiere que no es imprescindible realizar técnicas de detección de virus más complejas como la nested-PCR, que detecta hasta una copia del virus (Meseguer et al., 2002).

Diversos trabajos han demostrado una alta variabilidad en los resultados de los test de detección de VIH (Fiscus et al., 2000) y VHC (Bourlet et al., 2003) en líquido seminal entre distintos laboratorios, habiéndose propuesto la necesidad de desarrollar programas de control de calidad externo entre laboratorios que realicen estas técnicas (Bourlet et al., 2003).

TÉCNICAS PARA LA PREPARACIÓN DE SEMEN DE PACIENTES CON EIT PARA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

En cuanto a la preparación del semen se considera adecuada la aplicación de la técnica descrita por Semprini et al. (1992) que consiste en la realización de una selección espermática mediante gradiente de densidad, posteriormente realización de 2 lavados y swim-up. Mediante este protocolo se obtiene una fracción de espermatozoides móviles, libres de plasma seminal y otras células infectadas (leucocitos principalmente). No obstante, nuestra experiencia, nos dice que muchos semenes de varones con EIT no soportan tantos procedimientos de selección espermática, por lo que en muchas ocasiones se tiende a simplificar dichos procedimientos.

En caso de ICSI con espermatozoides testiculares se ha recomendado realizar varios lavados del material de biopsia y realizar detección de RNA VHC por PCR en el medio de cultivo de los cigotos y embriones en día+2. Manteniendo el mismo medio desde el día de la microinyección hasta D+2 para evitar posi-

bles falsos negativos por dilución (Manno et al., 2002).

PRECAUCIONES EN EL MANEJO DE SEMEN “POTENCIALMENE INFECCIOSO” PARA REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La primera medida de prevención frente a las enfermedades transmitidas por fluidos orgánicos consiste en el estricto cumplimiento de las precauciones estándar (CDC, 2001).

Las medidas preventivas a tener en cuenta serían:

- 1) Vacunación de la hepatitis B.
- 2) Normas de higiene personal.
- 3) Elementos de protección de barrera.
- 4) Precaución especial en el manejo de objetos punzantes o cortantes
- 5) Esterilización y desinfección correcta de instrumentos y superficies

En cuanto a esta última, en la medida de lo posible, todos los objetos o instrumentos que entren en contacto con el semen serán de un solo uso. En caso de que esto no sea posible estos objetos o instrumentos se deben esterilizar entre paciente y paciente. Se debe realizar una limpieza previa a la esterilización y desinfección ya que los desinfectantes más potentes pueden no ejercer su acción si el semen les impiden alcanzar la superficie sobre la que deben actuar. Por ello, todos los objetos que vayan a ser desinfectados o esterilizados deben ser sometidos a una limpieza previa. Tras su limpieza, los objetos deben ser aclarados antes de ser desinfectados o esterilizados en autoclave. Estos procedimientos se realizarán con guantes resistentes. La desinfección puede realizarse con glutaraldehído al 2%, peracético o hexanios durante 15-20 minutos y aclarados con agua estéril.

Por otro lado, si la superficie externa de los frascos de recogida de semen está contaminada, o se produce un derrame de este sobre una superficie, esta debe ser lavada con una solución desinfectante (por ejemplo 5.25 g/l de hipoclorito sódico o lejía diluida a 1:10) (WHO, 1999), aunque en el área de manipulación de embriones y gametos no es aconsejable el uso de lejía, por lo que esta puede ser sustituida por alcohol de 70%.

El uso de Luz Ultravioleta como método de desinfección en el Laboratorio de Reproducción Asistida no es recomendado. En primer lugar, por su escaso poder de penetración que hace que su capacidad de descontaminación sea muy limitada. Y en segundo lugar, por el posible daño que puede ocasionar a gametos y embriones. Recordar que el RD 413/96, en el

que se establecen los requisitos para homologar centros y servicios relacionados con Técnicas de Reproducción Asistida, exige que la Cabina de Flujo Laminar que se utilice en el Laboratorio de FIV sea sin rayos ultravioleta.

No tiene sentido la señalización especial en las muestras de sangre, fluidos y tejidos de las personas infectadas ya que confiere una falsa seguridad al personal sanitario. Además, ésta señalización vulnera el derecho a la intimidad y a la confidencialidad que asiste a todos los pacientes.

RECOMENDACIONES PARA LA MANIPULACIÓN DE SEMEN DE VARONES CON VIH, VHB Y VHC EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

El objetivo que se debe perseguir a la hora de atender a pacientes con enfermedades infecciosas es buscar el equilibrio entre seguridad y eficiencia. Es decir, no se trata de adoptar las máximas medidas de seguridad biológica (costosas y a veces innecesarias), si no medidas de seguridad biológica adecuadas al nivel de riesgo en el que se trabaja. En este contexto habría que definir los recursos necesarios y las prácticas adecuadas para la manipulación de este tipo de muestras.

El RD 664/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, clasifica como agentes biológico del grupo 3 a los virus VIH, VHC y VHB, por lo que correspondería un nivel de contención 3 para el uso del semen de varones infectados por estos virus. No obstante, el mismo real Decreto establece que la transmisión de estos tres virus no se produce normalmente por vía aérea (anexo IV RD 664/1997), por lo que permite prescindir de algunas medidas de contención destinadas a prevenir su transmisión por esta vía como es el caso de las cabinas de seguridad biológica. Así varias entidades y autores (Normativa francesa, 1999); Comisión Asesora de la Generalitat de Cataluña, 2002, ASRM, 2004) no incluyen el uso de estas cabinas entre sus recomendaciones. No obstante, otros autores las consideran fundamentales (Gilling-Smith et al., 2005).

Según la Normativa Francesa sobre Seguridad Biológica en el Laboratorio (1999), una de las medidas más importantes que deben instaurarse para la manipulación del material biológico de pacientes infectados con VIH, VHB y VHC es un circuito de riesgo viral que implica una disociación temporal de otros procesos terapéuticos de otros pacientes y una

disociación espacial de las actividades concernientes a pacientes de riesgo y a pacientes sanos, es decir, un área física diferenciada dotada de un puesto de trabajo completo y exclusivo para este tipo de material biológico. Creemos que una disociación temporal es una recomendación adecuada, en el caso de existir varios pacientes ese mismo día es conveniente atender en último lugar a los pacientes con enfermedades infecciosas. Sin embargo pensamos que la aplicación del nivel de contención 2 no exige una disociación espacial que implique el uso exclusivo de aparatos (microscopio, lupa, microinyectores, centrífuga, etc.) para estos pacientes. Una adecuada limpieza y desinfección permiten su uso posterior para otros pacientes.

En esta línea, sería suficiente designar dentro del laboratorio de reproducción asistida un área de trabajo específica con contenedores de desecho para evitar la circulación del material utilizado en el interior del laboratorio, tal como recomienda la Comisión Asesora de la Generalitat de Cataluña (2002), realizando el mayor número de actividades dentro de la cabina de flujo laminar vertical. La Comisión Asesora de la Generalitat de Cataluña sobre TRA humana recomienda únicamente el empleo exclusivo de la cabina de flujo laminar vertical y la incubadora de CO₂ para la manipulación del material biológico reproductivo de estos pacientes. Creemos que un adecuado mantenimiento y limpieza de la cabina de flujo laminar permite su empleo tanto para pacientes sanos como para pacientes infectados, manteniendo una disociación temporal, es decir, no manipulando muestras al mismo tiempo de distintos pacientes.

Otro caso completamente diferente es la incubadora de CO₂, ya que es imposible llevar a cabo una disociación temporal debido al cultivo durante varios días de embriones y cigotos. En este caso, sí creemos necesario la existencia de una incubadora de CO₂ exclusiva para este material biológico reproductivo, con el objetivo de evitar posibles contaminaciones al caer accidentalmente una placa. No obstante, para reducir este riesgo, la Comisión Asesora de la Generalitat de Cataluña recomienda recubrir las superficies de la incubadora con papel de aluminio. La campana y sus instrumentos (estereomicroscopio) se recubrirán de papel de filtro. De esta manera se podrá recoger cualquier gota que pueda caer y, a la vez, se evitará la contaminación de equipos. Otra posibilidad es la utilización de bloques de incubación individuales (Black Cube, IVFtech, Denmark, www.ivftech.dk), que permiten un cultivo independiente y aislado de las placas de estos pacientes, sin tener que utilizar una incubadora diferente.

Otras recomendaciones a tener en cuenta en el Laboratorio de Reproducción Asistida (Normativa francesa, 1999); Comisión Asesora de la Generalitat de Cataluña, 2002),

- 1) Procedimientos de trabajo y seguridad establecidos en protocolos escritos, actualizados y validados por las autoridades sanitarias.
- 2) Restringir acceso de personal no autorizado.
- 3) Emplear preferentemente batas de un solo uso o autoclavar.
- 4) Ausencia de objetos punzantes en zonas de trabajo.
- 5) Poner filtros de algodón a las pipetas Pasteur y a las puntas de las pipetas.
- 6) Empleo de Centrífugas con tapas de Seguridad así como sellar los tubos a centrifugar con Parafilm.

CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE VARONES CON EIT

La posible discusión sobre la utilización de contenedores exclusivos para estos pacientes recomendada por la ASRM (2004) o la Normativa francesa (1999), ha quedado resuelta con la publicación de la Directiva 2006/17/CE de la comisión europea de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos, y donde se obliga a dicha separación en el almacenamiento.

De igual manera, de todas las medidas propuestas para evitar la transmisión de estos virus durante el proceso de la congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (uso de contenedores de vapor de nitrógeno líquido o frío seco, congelación postselección espermática) las más efectivas y fundamentales son el uso automatizado de sistemas de almacenamiento de alta seguridad como la pajuelas de resina ionomérica termoselladas (Mortimer, 2004; Maertens et al., 2004).

BIBLIOGRAFÍA

1. **ASRM. Hepatitis and reproduction.** The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril* 2004; 82: 1754-1764.
2. **Barreiro P, Del Romero J, Leal M, Hernando V, Asencio R, De Mendoza C, Labarga P, González-Lahoz J, Soriano V.** Natural pregnancies in HIV-serodiscordant couples under successful antiretroviral therapy. *JAIDS* 2006a (in press).
3. **Barreiro P, Duerr A, Beckerman K, Soriano V.** Reproductive options in HIV-serodiscordant couples. *Lancet ID* 2006b (in press).
4. **Bourlet T, Levy R, Laporte S et al.** Multicenter quality control for the detection of hepatitis C virus RNA in seminal plasma specimens. *J Clin Microbiol*, 2003 Feb; 41(2): 789-93.
5. **British Columbia Health Service.** Clinical Management of Chronic Hepatitis C. 2004. http://www.healthservices.gov.bc.ca/msp/protopguides/gps/hepatitis_c.pdf.
6. **Bujan L, Pasquier C, Labeyrie E, Lanusse-Crousse P, Morucci M, Daudin M.** Insemination with isolated and virologically tested spermatozoa is a safe way for human immunodeficiency type 1 virus-serodiscordant couples with an infected male partner to have a child. *Fertil.Steril.* 2004;82:857-62.
7. **CDC.** Cómo Prevenir la Transmisión Ocupacional del VIH al Personal de Cuidado de Salud. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Prevención de VIH/SIDA. 2001 <http://www.cdc.gov/spanish/vih/pubs/facts/s-hcwprev.htm>.
8. **CDC.** Guidelines for Laboratory Testing and Results Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. *MMWR*. 2003; Vol. 52/No RR-3.
9. **Comisión Asesora sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida del Departamento de Sanidad y Seguridad Social de la Generalitat de Cataluña.** Técnicas de Reproducción Asistida y VIH. (CATRHAGC, 2002).
10. **Coombs RW, Speck CE, Hughes JP et al.** Association between culturable human immunodeficiency virus type I (HIV-1) in semen and HIV-1 RNA levels in semen and blood: evidence for compartmentalization of HIV-1 between semen and blood. *J Infect Dis* 1998; 177: 320-330.
11. **Dor GJ, Kaldor JM.** Detection of HCV RNA in semen. *Lancet* 2000; 356: 1520.
12. **Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L, Ingerman MJ et al.** Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA* 1999; 282: 1627-1632.
13. **Duffaut M, Valla D.** Procréation médicalement assistée et infection par le virus de l'hépatite C. *Contracept Fertil Sex* 1997; 25: 534-537.
14. **Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C et al.** Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 149-162.
15. **Esteban R.** Hepatitis por el virus C. *Medicine* 2004; 9: 658-662.

16. **Fiscus SA, Brambilla D, Coombs RW et al.:** Multicenter evaluation of methods to quantitate human immunodeficiency virus type 1 RNA in seminal Plasma. *J Clin Micro* 2000; 38: 2348-2353.
17. **Garrido N, Meseguer M, remohí J, Simon C, Pellicer A.:** Semen characteristics in human immunodeficiency virus (HIV)- and hepatitis C (HCV)-seropositive males: predictors of the success of viral removal after sperm washing. *Hum Reprod.* 2005 Apr; 20(4): 1028-34.
18. **Gilliam BL, Dyer JR, Fiscus SA et al.:** Effects of reverse transcriptase inhibitor therapy on the HIV-1 viral burden in semen. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 15: 54-60.
19. **Gilling-Smith C, Emiliani S, Almeida P, Liesnard C, Englert Y.:** Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Hum Reprod* 2005; 20: 1433-1438
20. **Gray R, Wayer M, Briikmeyer R, Sewankambo N et al.:** Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1 serodiscordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 2001; 357: 1149-1153.
21. **Klein J, Pena JE, Thornton MH, Saber MV.:** Understanding the motivations, concerns and desires of human immunodeficiency virus 1-serodiscordant couples wishing to have children through assisted reproduction. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 987-994.
22. **Lereuz-Ville M, Kunstmann JM, De Almeida M, Rouzioux C, Chaix ML.:** Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* 2000; 356: 42-43.
23. **Levy R, Tardy JC, Bourlet T, Cordonier H, Mion F, Lornage J et al.:** Transmission risk of hepatitis C virus in assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 810-816.
24. **Levy R, Bourlet T, Maertens A, Salle B et al.:** Pregnancy after safe IVF with hepatitis C virus RNA-positive sperm. *Hum Reprod* 2002; 17: 2650-2653.
25. **Maertens A, Bourlet T, Plotton N, Pozzetto B, Levy R.:** Validation of safety procedures for the cryopreservation of semen contaminated with hepatitis C virus in assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 2004 Jul; 19(7): 1554-7.
26. **Manno M, Marchesan E, Crovatto M, Martelli P, Tomei F, Adamo V.:** Preliminary evidence on the safety of ICSI with testicular spermatozoa in HCV-infected male: a case report. *Hum Reprod* 2003; 18: 1666-1668.
27. **Marina S, Marina F, Alcolea R et al.:** Human immunodeficiency virus type 1—serodiscordant couples can bear healthy children after undergoing intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 1998; 70: 35-9.
28. **Mencaglia L, Falcone P, Lentini GM, Consigli S, Pisoni M, Loffiego V, Guidetti R, Piomboni P, De Leo V.:** ICSI for treatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-serodiscordant couples with infected male partner. *Hum Reprod* 2005; 20, 2242-2246.
29. **Meseguer M, Garrido N, Gimeno C, Remohí J, Simón C, Pellicer A.:** Comparison of polymerase chain reaction: dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed semen. *Fertil Steril* 2002; 78: 1199-1202.
30. **Mortimer D.:** Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *RBMonline* 2004; 9: 134-151.
31. **Narayana K, D'Souza UJ, Rao S.:** Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. *Mutat Res* 2002; 15: 193-196.
32. **Normativa Francesa sobre Seguridad Biológica en Laboratorios de Reproducción Asistida.** Arrêté du mai 2001 modifiant l'arrêté du 12 janvier 1999 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques en assistance médicale à la procréation. *J.O. Numéro 112 du 15 mai 2001, page 7735 (Francia).* <http://admi.net/jo/20010515/SANP0121721A.html>.
33. **Ohl J, Partisani M, Wittemer C, Schmitt MP, Cranz C, Stoll-Keller F et al.:** Assisted reproduction techniques for HIV serodiscordant couples: 18 months of experience. *Hum.Reprod.* 2003; 18: 1244-9.
34. **Pasquier C, Daudín M, Righi L, Berges L et al.:** Sperm washing and virus nucleic acid detection to reduce HIV and hepatitis C virus transmission in serodiscordant couples wishing to have children. *AIDS* 2000;14:2093-2099.
35. **Pasquier C, Bujan L, Daudin M, Righi L et al.:** Intermittent detection of hepatitis C virus (HCV) in semen from men with human immunodeficiency virus type I (HIV-1) and HCV. *J Med Virol* 2003; 69: 344-349.
36. **Pérez-Millan F.:** Infección por virus de la Hepatitis C y Reproducción asistida. *Boletín SEF* 2002;10 (<http://nuevo.sefertilidad.com/boletin/2002/vol2/06.php>).
37. **Piomboni P, Mencaglia L, De Leo V.:** Reply to: 'Use of washed sperm for assisted reproduction in HIV-positive males without checking viral absence. A risky business?' *Hum Reprod* 2006; 21: 568.
38. **Pirwany IR, Phillips S, Nelly S, Buckett W, Tan SL.:** Reproductive performance of couples discordant for hepatitis B and C following IVF treatment. *J Assist Reprod Gen* 2004; 21: 157-161.
39. **Quinn TC, Waver MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F et al.:** Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000; 342: 921-929.

40. **Sauer M, Choi J.:** HIV-seroconversion in a woman preparing for assisted reproduction: an inherent risk in caring for HIV-serodiscordant couples RBM on line 2006; 12: 375-377.
41. **Sauer MV, Chang PL.:** Establishing a clinical program for human immunodeficiency virus 1-seropositive men to father seronegative children by means of in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 627-33.
42. **Semprini A, Levy-Setti P, Bozzo M y cols.:** Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners. *Lancet* 1992; 340: 1317-9.
43. **Semprini AE, Vucetich A, Hollander L.:** Sperm washing, use of HAART and role of elective Caesarean section. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* 2004; 16: 465-70.
44. **Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria. Hepatitis C.** Recomendaciones. 2003.
45. **Solas C, Lafeuillade A, Halfon P, Chadapaud S, Hittinger G, Lacarelle B.:** Discrepancies between protease inhibitor concentrations and viral load in reservoirs and sanctuary sites in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47: 238-243.
46. **Speck CE, Coombs RW, Koutsky LA, Zeh J, Ross SO et al.:** Risk factors for HIV-I shedding in semen. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 622-631.
47. **Vernazza P, Hollander L, Semprini AE, Anderson D, Duerr A.:** HIV-discordant couples and parenthood: how are we dealing with the risk of transmission? *AIDS* 2006 Feb 28; 20(4): 635-6.
48. **Steyaert SR, Leroux-Roels GG, Dhont M.:** **Infections in IVF:** review and guidelines. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 432-441.
49. **Xu C, Politch JA, mayer KH, Anderson DJ.:** Human immunodeficiency virus type-I episomal cDNA in semen. *AIDS Research and Therapy* 2005; 2: 9-15.
50. **WHO.** Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge:Cambridge University Press, 1999.

Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida

Juan G. Alvarez, MD, PhD.

Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN, La Coruña

Instituto Marqués, Barcelona

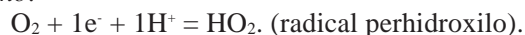
Harvard Medical School, Boston

INTRODUCCIÓN

El oxígeno atmosférico es de vital importancia en la producción de energía a nivel celular. Los electrones (e^-) y protones (H^+) derivados del metabolismo del piruvato en el *ciclo de Krebs* son transportados por el NADH a la cadena mitocondrial donde son utilizados para la biosíntesis de ATP. El oxígeno actúa como un colector o *sink* de estos electrones y protones. Una vez que éstos han pasado por los diferentes citocromos de la cadena mitocondrial, reaccionan con el oxígeno para dar lugar a una molécula de agua: $1/2 O_2 + 2e^- + 2H^+ = H_2O$.

A diferencia de lo que ocurre en las células animales, en las plantas se produce un proceso de fotólisis del agua y liberación de oxígeno que pasa a la atmósfera para luego ser respirado por animales y poder ser utilizado en la mitocondria para producir ATP.

Sin embargo, la reducción del oxígeno molecular en la mitocondria no siempre resulta en la producción de agua sino que en algunos casos se produce una reducción monovalente del mismo dando lugar a la formación de los llamados *radicales libres del oxígeno*:



El radical perhidroxilo, a diferencia del oxígeno o del agua, tiene un electrón no apareado (representado en la fórmula por el punto en superíndice) en el último orbital molecular. De ahí su denominación de *radical*.

La designación de *libres* se deriva del hecho de que no están ligados a moléculas orgánicas, difunden a grandes velocidades y pueden destruir cualquier molécula orgánica que encuentren en su camino, ya

sean lípidos, proteínas, carbohidratos o DNA. Es decir, se comportan como auténticos *misiles biológicos*. De ahí su denominación de *Reactive Oxygen Species* o *ROS*.

Las células expuestas al aire atmosférico producen radicales libres en mayor o menor grado. Esto va a depender no sólo de la capacidad que la propia célula tenga de producir radicales, que podría estar relacionada con la actividad del ciclo de Krebs en esa célula o con la presencia de otros sistemas de generación de ROS (como la NADPH oxidasa en el caso de los leucocitos) sino que también de (i) los *sistemas antioxidantes* de los que disponga esa célula (utilizando el símil anterior de los misiles biológicos, los *sistemas antioxidantes se comportarían como las defensas antimisiles*); (ii) de la presión parcial de oxígeno (pO_2); y (iii) de la temperatura. Cuanto mayor sea la pO_2 , mayor va a ser la producción de ROS y cuanto mayor sea la temperatura mayor va a ser la velocidad de difusión y la reactividad de los ROS con diferentes biomoléculas. Por ejemplo, estudios previos demuestran que los espermatozoides producen mayores niveles de ROS a 159 mmHg (pO_2 en la atmósfera terrestre al nivel del mar que es equivalente a un 21% de oxígeno) que a 60 mmHg que es la pO_2 en el oviducto durante la ovulación (Maas et al., 1976) o que a 10 mmHg que es la pO_2 en el epidídimo (Alvarez and Storey, 1989). Del mismo modo, también se ha demostrado que los embriones producen menos cantidad de radicales libres a 40 mmHg (equivalente a un 5% de O_2) que cuando están expuestos a la atmósfera habitual de los incubadores (pO_2 de 159 mmHg).

Cuando la producción de ROS por las células excede su capacidad de interceptarlos y eliminarlos al-

canzando unos niveles tóxicos, se produce un *desequilibrio oxidativo que se conoce como estrés oxidativo*. Este proceso, en el caso de los espermatozoides, se ha demostrado puede producir peroxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana, cross-linking de proteínas y fragmentación de DNA.

ESTRÉS OXIDATIVO Y FISIOLÓGIA ESPERMÁTICA

Estrés oxidativo en espermatozoides

Estudios previos demuestran que los espermatozoides producen y exportan ROS al medio extracelular (Alvarez y Storey, 1982a, 1984a; 1984b; 1985; 1987). La mayoría de estos ROS son producidos por la mitocondria y son el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa (Holland et al., 1982). Estos estudios también demostraron que los ROS inducen peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados esterificados a fosfolípidos de membrana e inactivan enzimas glucolíticas (Alvarez and Storey, 1984b; 1995). La peroxidación de los ácidos grasos produce una permeabilización de las membranas plasmática y acrosomal conduciendo a una pérdida de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide (Alvarez and Storey, 1984b). Por otra parte, la inactivación de enzimas glucolíticas conlleva un bloqueo en la biosíntesis de ATP y la consiguiente pérdida de motilidad, que en este caso es por "falta de combustible" necesario para la contracción de los microtúbulos flagelares y no por "pérdida de combustible" o ATP a través de la membrana, como en el caso de la peroxidación lipídica (Álvarez and Storey, 1984b) que produce verdaderos agujeros en las membranas espermáticas.

Los espermatozoides están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de los ROS. Además de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) (Alvarez and Storey, 1983), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Alvarez and Storey 1989; Storey et al., 1998), los espermatozoides han desarrollado a lo largo de la evolución una estrategia metabólica dirigida a minimizar el estrés oxidativo. Esta estrategia consiste en utilizar la glucólisis anaeróbica como fuente principal de energía celular en lugar del ciclo de Krebs. Si bien esta última ruta metabólica es mucho más eficaz que la primera (se producen 36 moléculas de ATP en el ciclo de Krebs vs. 4 en la glucólisis anaeróbica), ésta supone la entrada de equivalentes reductores de NADH en la mitocondria y el

riesgo consiguiente de generar ROS durante el transporte electrónico en la cadena mitocondrial.

Por otra parte, los túbulos seminíferos también están protegidos contra el estrés oxidativo. De hecho, muestran una expresión estadio-dependiente de la enzima antioxidante SOD (Jow et al., 1993). Además, la temperatura más baja a la que está expuesto el testículo contribuye a disminuir el riesgo de peroxidación lipídica y de daño de DNA (Alvarez and Storey, 1987). Esto es especialmente relevante, ya que de todas las células corporales, las células germinales son las que tienen un mayor contenido de ácido docosa-hexaenoico (DHA), el ácido graso más sensible a la peroxidación lipídica (Alvarez and Storey, 1995; Ollero et al., 2000). Este efecto protector de una temperatura testicular más baja se basa en el hecho de que la peroxidación lipídica en espermatozoides tiene un coeficiente de temperatura muy elevado, haciéndose exponencial la tasa de peroxidación a temperaturas superiores a los 36°C (Alvarez and Storey, 1987). Esto explicaría, al menos en parte, por qué los espermatozoides son almacenados en el epidídimo a temperaturas por debajo de los 36°C.

Numerosos estudios han demostrado la relevancia clínica del estrés oxidativo en la etiología de la infertilidad masculina. Estos estudios demuestran que los niveles de ROS producidos en pacientes de infertilidad son significativamente más altos que en hombres fértiles (Aitken 1994). Esto parece estar relacionado con lo que se ha designado como espermiogénesis defectuosa, en la cual los espermatozoides no experimentan el proceso de maduración normal, saliendo a los túbulos seminíferos o "graduándose" espermatozoides inmaduros que producen niveles altos de ROS (Aitken and Clarkson, 1987). La espermiogénesis defectuosa ha sido recientemente asociada al varicocele (Zini et al., 1999).

La mayoría de los estudios realizados hasta ahora sobre estrés oxidativo en infertilidad masculina se han centrado únicamente en espermatozoides eyaculados. Si bien estos estudios han contribuido a mejorar nuestro conocimiento sobre los efectos de los ROS en la función espermática, no han tenido en cuenta el daño que se puede producir en el epitelio de los túbulos seminíferos y durante el transporte de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos al epidídimo.

Estrategia metabólica del espermatozoide y estrés oxidativo

La estrategia metabólica del espermatozoide está dirigida a la producción de fuerza contráctil. Esto va a depender de la capacidad del espermatozoide de

producir ATP que luego será utilizado como sustrato de la ATPasa situada en los brazos de dineína para convertir la energía química en trabajo mecánico por las proteínas contráctiles del flagelo. Esto supone que la maquinaria metabólica del espermatozoide está principalmente dedicada a la producción de ATP para el trabajo contráctil de los microtúbulos del flagelo espermático. Únicamente pequeñas cantidades de ATP son consumidas en otras funciones espermáticas como las relacionadas con el proceso de fecundación. La conversión preferente de glucosa a lactato en condiciones aeróbicas a través de la glucólisis o vía metabólica de Embden-Meyerhof, parece ser una peculiaridad crucial en la evolución de los espermatozoides, quizás dirigida a minimizar el acúmulo de equivalentes reductores en la mitocondria y, por lo tanto, reducir la producción de ROS. La conversión de glucosa a lactato en condiciones aeróbicas disminuiría la producción de equivalentes de NADH y FADH derivados del ciclo de Krebs y el flujo de electrones a través de la membrana mitocondrial interna, regulando a la baja o *downregulating* la producción de ROS.

Estrés oxidativo y temperatura escrotal

Análisis por curvas de Arrhenius en suspensiones de espermatozoides incubados a diferentes temperaturas indican que la tasa de peroxidación lipídica en espermatozoides tiene un elevado coeficiente de temperatura. Estos estudios muestran que la tasas de peroxidación lipídica o *bombardeo oxidativo* al que las membranas espermáticas y DNA son sometidos aumentan de forma exponencial a temperaturas por encima de los 36°C (Alvarez and Storey, 1987).

En condiciones fisiológicas la temperatura testicular está controlada por un sistema de termorregulación muy sofisticado que minimiza el riesgo de peroxidación lipídica durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo. Este sistema termorregulador está integrado por el músculo cremáster, el plexo pampiniforme y las arrugas escrotales. Sin embargo, existen una serie de situaciones que aumentan la temperatura testicular y la tasas de peroxidación. Estas situaciones incluyen el varicocele, episodios de fiebre alta, hábitos sedentarios y riesgos laborales (industria de cerámica, vidrio, panaderos, etc.).

No obstante, también existe riesgo de daño oxidativo inducido por ROS a temperaturas por debajo de los 36°C como, por ejemplo, la fragmentación del DNA espermático, el daño de enzimas acrosómicas, el daño del factor activador del ovocito y el daño del axonema. Esto va a depender del tipo de radicales

producidos, del porcentaje de espermatozoides inmaduros productores de ROS que pasen por el epidídimo en cada oleada espermática y de la producción de óxido nítrico por las células epiteliales epididimarias como resultado de la activación de la iNOS.

Estrés oxidativo e inflamación

Como ya se ha indicado anteriormente, no todos los espermatozoides liberados a los túbulos seminíferos experimentan un proceso de espermiogénesis normal. De hecho, se considera normal que el porcentaje de formas anormales en semen por criterios estrictos de Tygerberg sea $\leq 95\%$. En otras palabras, se considera normal que el 95% de los espermatozoides sean inmaduros. Un alto porcentaje de estos espermatozoides inmaduros producen ROS. Es bien conocido el hecho de que en pacientes de infertilidad existe un porcentaje alto de espermatozoides anormales con retención proximal de citoplasma. Estos espermatozoides producen niveles muy altos de ROS (Aitken et al., 1994; Gil-Guzman et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que estos espermatozoides inmaduros cuando se encuentran en contacto con macrófagos o neutrófilos activados producen niveles muy altos de ROS (Saleh et al., 2002a). Este aumento en la producción de ROS parece estar relacionado con factores solubles producidos por estas células proinflamatorias tales como interleukinas y prostaglandinas. Por lo tanto, en presencia de procesos inflamatorios y/o factores pro-inflamatorios, los espermatozoides inmaduros pueden producir niveles de ROS comparables a los producidos por leucocitos activados (Saleh et al., 2002a).

Estrés oxidativo y proximidad celular

Dado que los espermatozoides exportan ROS al medio extracelular y que la vida media de los ROS es del orden de nano a microsegundos, para que se produzca daño inducido por ROS, espermatozoides inmaduros productores de ROS y espermatozoides maduros deben estar en íntimo contacto. De lo contrario, los ROS se desactivarían antes de llegar a la célula vecina si ésta se encontrase alejada como ocurriría en suspensiones de espermatozoides diluidas (Álvarez et al., 2002). Dado que los espermatozoides se encuentran altamente empaquetados en el epidídimo esto facilitaría el daño inducido por ROS a nivel de la membrana y el DNA. Algo similar podría ocurrir a nivel de las células de Sertoli y células germinales en el epitelio de los túbulos seminíferos, ya que estas células se encontrarían en íntimo contacto. Esta hipótesis viene avalada por una observación previa en la que se

encontró que los niveles de ROS medidos en el medio extracelular muestran una dependencia hiperbólica en función de la concentración espermática (Holland et al., 1982). Es decir, a concentraciones espermáticas más bajas, donde las células se encuentran más alejadas unas de otras, la dependencia es lineal, mientras que a concentraciones más altas, cuando las células están más próximas unas de otras, la dependencia es hiperbólica (Holland et al., 1982). Por lo tanto, a concentraciones más altas, dada la vida media corta de los ROS y que los espermatozoides están en íntimo contacto, los ROS reaccionarían con las células vecinas y no serían detectados, al menos en parte. También cabe destacar que la eliminación de las membranas de los espermatozoides mediante un tratamiento hipotónico disminuyó de forma significativa esta dependencia hiperbólica, haciéndose más lineal incluso a altas concentraciones espermáticas, sugiriendo que los ROS estaban reaccionando en su mayor parte con las membranas espermáticas. La dependencia hiperbólica residual, que todavía persistía después de eliminar las membranas, sugiere que los ROS estaban reaccionando con otros componentes celulares como el DNA y el axonema.

Estrés oxidativo y necroastenozoospermia

La presencia de espermatozoides inmaduros productores de ROS en el epidídimo puede resultar en la inducción de daño de membrana y DNA en espermatozoides maduros. Dado que espermatozoides maduros e inmaduros están en íntimo contacto durante varios días a su paso por el epidídimo, en pacientes de infertilidad que tienen un porcentaje más alto de espermatozoides inmaduros productores de ROS o en los que el epidídimo se encuentre en un estado pro-inflamatorio, sus espermatozoides están expuestos a un mayor riesgo de daño de membrana. Esto resultaría en una pérdida de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante espermática, comparado con pacientes en los que el porcentaje de espermatozoides productores de ROS es más bajo o en los que el epidídimo no se encuentre en un estado inflamatorio. Existen varias líneas de evidencia que apoyan la hipótesis de la inducción de necroastenozoospermia durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo: (i) la depleción epididimaria después de varias eyaculaciones consecutivas mejora de forma significativa la viabilidad espermática. Es decir, la depleción de espermatozoides y líquido epididimario del cuerpo y cola del epidídimo facilitaría la eliminación de factores pro-inflamatorios y factores tóxicos que pudieran encontrarse en el epidídimo, permitiendo la llegada de espermatozoides de la *rete testis* que todavía no han sido expuestos a estos factores; (ii) estu-

dios previos han demostrado que la administración de agentes anti-inflamatorios mejora de forma significativa la necroastenozoospermia (Montag et al., 1999; Moskovitz et al., 1988).

Estrés oxidativo y varicocele

El varicocele ha sido asociado con una mayor producción de ROS y que esto podría estar relacionado con una espermiogénesis defectuosa y un aumento en el porcentaje de espermatozoides inmaduros con retención proximal de citoplasma liberados en los túbulos seminíferos. (Zini et al., 1999). De hecho, se ha demostrado que la varicolectomía conlleva una reducción significativa en la producción de ROS en estos pacientes (Zini et al., 1999) y un aumento en las tasas de embarazo debido a una reducción en los niveles de fragmentación del DNA espermático inducido por ROS (Smith et al., 2005). También se ha publicado que el varicocele se asocia a la producción de niveles elevados de ROS, en especial de óxido nítrico, y que la toxicidad del varicocele se relaciona con los niveles de este radical (Romeo et al., 2001). Como consecuencia, la presencia de un varicocele testicular podría aumentar de forma significativa el riesgo de estrés oxidativo en estos pacientes. Por lo tanto, la varicolectomía y el uso de agentes antioxidantes y anti-inflamatorios podría ser de gran utilidad en estos pacientes.

Estrés oxidativo y daño en el epidídimo

Estudios publicados por Wiszniewska et al., (Wiszniewska et al., 1997) y Zini (Zini et al., 1996), han demostrado que las células epiteliales epididimarias expresan niveles muy altos de la forma inducible de la sintetasa de óxido nítrico (iNOS) y que la presencia de factores pro-inflamatorios tales como LPS y γ -interferón resulta en un aumento en la producción de óxido nítrico por parte de estas células (Kurzawa et al., 1996; O'Bryan et al., 2000). Por lo tanto, la presencia de factores pro-inflamatorios en el epidídimo podría resultar en daño extracelular y una reacción inflamatoria local. Además, se ha publicado que la presencia de un episodio febril o la exposición a temperaturas superiores a 40°C puede inducir un aumento en la producción de óxido nítrico por activación de iNOS, con el consiguiente daño oxidativo y fragmentación de DNA (Banks et al., 2005).

Estrés oxidativo y daño del acrosoma

Otro ejemplo de daño oxidativo durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo lo constituye el daño del acrosoma. La inducción de pe-

oxidación lipídica por ROS no sólo puede resultar en la permeabilización de la membrana plasmática sino también de la membrana acrosomial. Se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno induce daño del acrosoma e inhibe la inducción de la reacción acrosómica (Oehninger et al., 1995). Curiosamente, la membrana del acrosoma puede dañarse sin efecto aparente alguno en la motilidad espermática (Griveau et al., 1995).

Estrés oxidativo y fragmentación de DNA

Estudios recientes demuestran que espermatozoides inmaduros que producen niveles elevados de ROS pueden inducir daño de DNA en espermatozoides maduros. Este daño se produciría después de la espermiación durante la co-migración de espermatozoides maduros e inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo (Ollero et al., 2001). Dado que los espermatozoides se encuentran en íntimo contacto en el epidídimo, y que la vida media de los ROS es del orden de nano a microsegundos, esto facilitaría el que los ROS induzcan fragmentación de DNA a nivel del epidídimo, ya sea actuando directamente sobre el DNA o bien indirectamente mediante la activación de endonucleasas y caspasas espermáticas. Esto es consistente con el hecho de que la co-centrifugación de espermatozoides inmaduros (que producen niveles elevados de ROS) con espermatozoides maduros resulta en la inducción de fragmentación de DNA en estos últimos, ya que en estas condiciones estos espermatozoides también se encontrarían en íntimo contacto (Twiggs et al., 1998). Esto también es consistente con el hecho de que la exposición *in vitro* de espermatozoides maduros a ROS resulta en daño significativo de DNA (Aitken et al., 1998; Lopes et al., 1998). Por otra parte, el mismo epidídimo podría también jugar un papel activo a la hora de inducir fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por el mismo, ya sea producido por radicales libres como el anión superóxido (Britan et al., 2006), el radical hidroxilo o el óxido nítrico, o bien mediante la activación de caspasas y endonucleasas espermáticas por agentes tóxicos o por factores pro-inflamatorios a nivel del epididimario. En el primer caso, este tipo de daño podría prevenirse mediante el uso de agentes antioxidantes, mientras que en el segundo caso este tratamiento carecería de eficacia. Esto viene avalado por los resultados recientemente publicados por Greco et al., donde el uso de antioxidantes produjo una reducción significativa en los niveles de fragmentación de DNA en pacientes con niveles elevados

de fragmentación de DNA en semen (Greco et al., 2005).

Probablemente, los espermatozoides que expresen un mayor daño de DNA sean aquellos que adquieran un menor grado de *crosslinking* de puentes disulfuro en la cromatina espermática durante su maduración en el epidídimo. En este sentido, estudios recientes han demostrado que, en general, el grado de fragmentación de DNA en espermatozoides eyaculados es más alto que en espermatozoides testiculares (Greco et al., 2005; Steele et al., 1999) y espermatozoides del cuerpo y cabeza del epidídimo (que es donde se completa el proceso de *crosslinking*) y que la inducción de fragmentación de DNA en los espermatozoides a su paso por el epidídimo podría estar relacionada con la calidad genómica del espermatozoide. Es decir, además del mecanismo de *screening* de la célula de Sertoli existiría otro mecanismo de *screening* a nivel del epidídimo dirigido a eliminar espermatozoides genómicamente defectuosos (Suganuma et al., 2005).

El daño potencial de DNA que los espermatozoides pueden experimentar a su paso por el epidídimo tiene una gran trascendencia clínica, ya que en casos de niveles elevados de fragmentación de DNA en semen y fallo en dos o más ciclos de FIV/ICSI, podría recurrirse a la microinyección de espermatozoides testiculares obtenidos mediante técnica de TESA o TESE (preferiblemente TESA, dado que es menos invasiva y gozaría de una mayor aceptación por parte del paciente y del ginecólogo). Esto viene avalado por los resultados obtenidos en un estudio publicado por Greco et al., donde la microinyección de espermatozoides testiculares en pacientes con un nivel de fragmentación de DNA en semen > 15%, medido por el test TUNEL, resultó en una tasa de embarazo del 44,4%, mientras que con espermatozoides eyaculados la tasa de embarazo evolutivo fue del 0% (Greco et al., 2005).

Cabe destacar que la fragmentación de DNA inducida por el radical hidroxilo resulta en la formación de 8-OH-guanina y 8-OH-2'-deoxiguanosina en un primer estadio seguido de fragmentación de DNA de cadena doble (Cui et al., 2000). Mientras que el daño de DNA del primer tipo pudiera ser reparado por el ovocito, la fecundación de un ovocito por un espermatozoide con fragmentación de DNA de cadena doble es prácticamente irreversible e incompatible con el desarrollo de un embarazo a término. Dado que valores de fragmentación de DNA en espermatozoides eyaculados > 20%, medidos por TUNEL (Sergerie et al., 2005), o > 30%, medidos por el test SCSA (Evenson et al., 1999), están asociados a tasas de embarazo < 5%, la pregunta que surge es que ocurre con

el 80% y 70% restante de los espermatozoides. En estos casos, la probabilidad de que un espermatozoide con un DNA normal fecunde al ovocito debería de ser del 80% y 70%, respectivamente y no < 5%. Sin embargo, además de que un 20% y 30% de los espermatozoides tengan roturas en la cadenas de DNA, el resto de los espermatozoides podrían tener modificaciones en las bases de DNA del tipo de 8-OH-guanina and 8-OH-2'-deoxiguanosina. Por lo tanto, la probabilidad de que un espermatozoide con DNA normal fecunde al ovocito sería mucho más baja que la esperada con un valor de fragmentación de DNA del 20% o 30%, respectivamente. Es decir, además de la fragmentación de DNA medible del 20% y 30% (*daño primario*), el 80% y 70% restante de los espermatozoides tendrían otro tipo de daño (*daño secundario*) que no miden los test habituales de fragmentación de DNA y que, de no ser reparado, no es compatible con el desarrollo de un embarazo a término. Este concepto ha sido designado como el "efecto iceberg" (Evenson et al., 1999).

Estrés oxidativo y daño del axonema espermático

Estudios previos indican que los ROS pueden dañar el axonema espermático (Álvarez and Storey, 1984b). La pérdida de motilidad en espermatozoides epididimarios de conejo, tras la incubación aeróbica a 37°C en medio con una alta concentración de K⁺ fue reversible después de la adición del agente reductor ditiotreitól si se añade durante las primeras 4 horas de incubación pero irreversible si se añade después de las 4 horas. Uno de los mecanismos postulados es que los ROS pueden inducir daño reversible por modificación oxidativa del centro activo de la enzima glucolítica gliceraldehido-6-fosfato-deshidrogenasa, presente en el axonema espermático y una enzima clave en la producción de ATP durante la glucólisis anaeróbica. La formación de un grupo sulfato intermediario causaría una modificación irreversible en el centro activo de la enzima y el consiguiente bloqueo en la síntesis de ATP.

Además de la inactivación de enzimas glucolíticas, los ROS también pueden afectar la utilización del ATP por la ATPasa flagelar o dañar componentes del citoesqueleto del axonema espermático. De hecho, los ROS han sido relacionados con la disrupción de microfilamentos y microtúbulos en el citoesqueleto neuronal y más específicamente de tubulina, actina y vimentina (Allani et al., 2004). Además, el óxido nítrico y sus metabolitos inducen daño de microtúbulos en células intestinales y el pre-tratamiento con el inhibidor selectivo de iNOS, L-N(6)-l-iminoetil-lisina, o con antioxidantes, atenúa este daño.

Cómo podemos medir el estrés oxidativo en pacientes de infertilidad

Si bien los ROS pueden ser medidos en semen por métodos de quimiluminiscencia, esta metodología requiere el uso de equipos de laboratorio muy costosos que habitualmente no están disponibles en la gran mayoría de los laboratorios de andrología. Además, dado que la vida media de los ROS es muy corta tendrían que aplicarse en un período relativamente corto después de la eyaculación (menos de 1 hora). Estas limitaciones hacen difícil el análisis de ROS incluso en laboratorios de referencia que puedan contar con equipos de quimiluminiscencia.

Los *isoprostanos* son derivados estables de la peroxidación lipídica inducida por ROS y pueden ser medidos en sangre y en orina (Morrow and Roberts, 1999). A diferencia de los ROS, los isoprostanos, una vez producidos, son relativamente estables y pueden almacenarse y medirse en laboratorios de referencia, ya sea por cromatografía de gases/espectrometría de masas o por inmunoensayos de ELISA (Il'yasova et al., 2004).

Dado que el estrés oxidativo suele ser un fenómeno sistémico, la presencia de estrés oxidativo a nivel testicular podría ser determinado no sólo en el líquido seminal sino también en orina o en plasma. Recientemente se han publicado concentraciones relativamente elevadas de nitritos urinarios y los isoprostanos-F(2), un índice de estrés oxidativo, en casos de infecciones genitales causadas por Chlamydia (Ramsey et al., 2003). El consumo crónico de flavonoles ha sido asociado a una disminución en la concentración de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) en el testículo (Orozco et al., 2003) demostrando que las dietas ricas en flavonoles mejoran las defensas antioxidantes y reducen los niveles de marcadores tisulares de estrés oxidativo como los isoprostanos. Estos estudios sugieren que los niveles de isoprostanos en líquido seminal o en plasma podrían utilizarse como marcadores bioquímicos de estrés oxidativo para el diagnóstico de la infertilidad masculina y el seguimiento de pacientes tratados con terapia antioxidante.

ESTRÉS OXIDATIVO Y REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Métodos de preparación del semen y estrés oxidativo

Una vez que se completa el proceso de espermiogénesis, los espermatozoides se desprenden de los

complejos túbulobulbares de las criptas de la célula de Sertoli, pasando a la luz de los túbulos seminíferos mediante el llamado proceso de espermiación. Si durante los estadios iniciales de la espermatogénesis, *las meiosis I y II van a determinar la composición cromosómica de los espermatozoides*, el proceso de *espermiogénesis va a determinar la configuración fenotípica o morfológica del espermatozoide*. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras especies de mamíferos, como es el caso de la rata, la espermiogénesis en el hombre es altamente ineficaz, de tal forma que por criterios estrictos de morfología de Tygerberg, se considera normal que el 95% de los espermatozoides liberados a los túbulos seminíferos sean morfológicamente anormales. Si bien todavía no se conocen los mecanismos moleculares que regulan el extenso remodelado citoplasmático y nuclear que las espermátides experimentan durante el proceso de espermiogénesis, se sabe que en la rata existen 19 “steps” o pasos de diferenciación celular, mientras que el hombre únicamente existen 8. Dado que estos pasos funcionan como un sistema de control de calidad, ello podría explicar, al menos en parte, la relativa ineficacia de la espermiogénesis en el hombre y por qué en la rata el 95% o más de los espermatozoides producidos son morfológicamente normales. Una de las consecuencias más importantes de esta deficiencia biológica en el hombre es que la mayoría de los espermatozoides liberados a los túbulos están constituidos por subpoblaciones de espermatozoides inmaduros en diferentes estadios de diferenciación debido a una maduración incompleta. Una de estas subpoblaciones está formada por espermatozoides inmaduros con retención proximal de citoplasma, que producen niveles elevados de radicales libres (ROS) (Gil-Guzman et al., 2001). Este citoplasma residual debería haber quedado retenido en los complejos túbulobulbares de las criptas de la célula Sertoli, donde una vez fagocitado por esta célula, sería digerido en la zona basal de la misma. Dado que espermatozoides maduros e inmaduros se encuentran en íntimo contacto durante las dos semanas que suele durar su transporte desde los túbulos seminíferos al epidídimo, en aquellos pacientes de infertilidad en los que la proporción de espermatozoides inmaduros con retención proximal de citoplasma sea relativamente alta, habría un mayor riesgo de que se produzca daño oxidativo a nivel de las membranas, citoesqueleto, enzimas y DNA. Esto pudiera resultar en pemeabilización de la membrana plasmática, con la consiguiente necro- y astenozoospermia, daño del acrosoma, daño de centriolos, daño de fosfolipasa C_{zeta} (que es el factor de activación del ovocito) y fragmentación de DNA.

Cuando este daño es inducido de forma iatrogénica durante la preparación del semen, se le conoce como *disfunción espermática iatrogénica* (Mortimer, 2000).

La presencia de estas subpoblaciones de espermatozoides maduros e inmaduros en el semen va a ser de gran relevancia en la elección de los métodos que se van a utilizar en la preparación de los espermatozoides para técnicas de reproducción asistida (TRA).

Una vez que los espermatozoides llegan a la cola del epidídimo, van a ser almacenados aquí durante un período variable de tiempo hasta que se produzca la eyaculación. Durante ésta, la secreción de las vesículas seminales, de la próstata y de las glándulas de Cowper (líquido seminal) va a diluir el concentrado de espermatozoides que proviene de la cola del epidídimo y de la ampolla deferencial. El líquido seminal contiene una serie de factores que van a regular la función de los espermatozoides antes de su entrada en el útero. Como es bien sabido, los espermatozoides de mamíferos, incluyendo el hombre, una vez eyaculados, son incapaces de fertilizar el ovocito sin antes experimentar un proceso de maduración final conocido como *capacitación espermática*. La capacitación consiste en una cascada de reacciones bioquímicas que se inician con la salida de colesterol de la membrana y la formación de los llamados “lipid rafts”, y que confluyen en la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas flagelares, la expresión de fosfatidilserina en la zona apical de la cabeza y un aumento en la concentración de NADPH (de Vries et al., 2003; Travis et al., 2004). La capacitación es esencial tanto en fertilización *in vivo* como *in vitro* y por ello es necesario capacitar a los espermatozoides cuando se va a realizar FIV convencional. El líquido seminal, además de factores decapacitantes como el colesterol, que inhiben la capacitación espontánea de los espermatozoides tras la eyaculación, también contiene otros factores que pueden interferir con la penetración del moco cervical, la reacción acrosómica *in vitro* y el proceso de fertilización. El contacto con el líquido seminal por un período superior a los 30 minutos post-eyaculación puede disminuir de forma permanente la capacidad fertilizante de los espermatozoides *in vitro*, y, por otra parte, la contaminación de una mínima cantidad de líquido seminal en espermatozoides procesados puede inhibir su capacidad fecundante. Por lo tanto, los espermatozoides que se vayan a utilizar en inseminación intrauterina o en FIV convencional deberían de ser aislados del líquido seminal, no sólo lo antes posible después de la eyaculación y licuación del semen, sino también lo más eficientemente posible. En laboratorios de andrología y de FIV, esta necesidad se manifiesta como el “sperm

washing” o separación de los espermatozoides del líquido seminal y su resuspensión en un medio de cultivo isotónico.

¿Puede la centrifugación del semen dañar a los espermatozoides?

En términos físicos, la centrifugación pudiera ser perjudicial para los espermatozoides pero esto no parece afectar la función espermática hasta que no se alcanzan fuerzas gravitatorias por encima de las 800g (Jeulin et al., 1982). Sin embargo a finales de los años 80 se descubrió que el *pelleting* o “co-centrifugación” de las subpoblaciones de espermatozoides presentes en el semen, a las que hacíamos referencia antes, con frecuencia resulta en daño oxidativo significativo, que pudiera afectar de forma irreversible la función espermática *in vitro* (Aitken y Clarkson, 1988). Una revisión posterior pone de manifiesto el impacto potencial de este proceso sobre la función de los espermatozoides *in vitro*, indicando que los métodos de preparación del semen que incluyen un paso previo de centrifugación pueden interferir con la función espermática y disminuir las tasas de fertilización, o incluso resultar en fallo de fertilización en casos más extremos (Mortimer, 1991). La conclusión de estos estudios fue que se debería abandonar la práctica de métodos de preparación del semen que incluyan la centrifugación previa del mismo y pasar a utilizar métodos de preparación más seguros como los gradientes de densidad. Si bien estos estudios demostraron la existencia del daño inducido por ROS, ninguno examinó en profundidad el llamado proceso de disfunción espermática iatrogénica derivado de una preparación del semen no segura (Mortimer, 2000).

Nuestro conocimiento de los mecanismos a través de los cuales los leucocitos y los espermatozoides inmaduros producen ROS e inducen daño oxidativo en espermatozoides maduros (Ollero et al., 2001) nos proporciona una explicación mecanística del problema de disfunción espermática iatrogénica. Obviamente, no va a afectar a todos los pacientes por igual, especialmente a aquellos con parámetros seminales normales. Sin embargo, la gran mayoría de los pacientes que acuden a las clínicas de *in vitro*, dada la mala calidad de su semen, estarían a un mayor riesgo de daño iatrogénico durante la preparación del semen para TRA. Por lo tanto, la conclusión antes planteada sigue siendo válida en el sentido de que las técnicas de preparación de espermatozoides que incluyan el paso previo de la centrifugación del semen, en el cual éste se diluye con medio de cultivo, se centrifuga y el pellet se cubre con medio de cultivo, como se hace en

la técnica *swim-up* estándar, ha de ser reconocido como potencialmente perjudicial y a veces letal para los espermatozoides así preparados. Métodos alternativos de preparación tales como el *swim-up* directo del semen licuado, ciertos métodos de adherencia y la centrifugación por gradientes de densidad, deberían de ser prioritariamente utilizados en la preparación de espermatozoides para TRA.

Excepciones a esta regla serían casos de oligospermia y astenozoospermia severa, y muestras de semen contaminadas o potencialmente contaminadas con VHC y VIH, en los que el realizar un gradiente sería desaconsejable, y si hacer un paso previo de dilución y centrifugación del semen.

Estrés oxidativo y desarrollo embrionario

El embrión puede producir niveles altos de ROS como consecuencia de la actividad de la enzima xantina oxidasa (Burton et al., 2003) y del metabolismo mitocondrial. El nivel fisiológico de redox es de vital importancia en el desarrollo embrionario. La superproducción de ROS puede ser perjudicial para el desarrollo embrionario (Guerin et al., 2001; Harvey et al., 2002). Las condiciones habituales de cultivo embrionario *in vitro* resultan en una producción excesiva de ROS y estrés oxidativo que puede comprometer el desarrollo embrionario antes de su implantación en el endometrio. En particular, el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo pueden afectar de forma significativa la viabilidad embrionaria. Los ROS pueden generarse en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa, como ya habíamos indicado anteriormente, y también en el citosol a partir de la NADPH-oxidasa, el complejo enzimático del citocromo p450 y la xantina oxidasa.

ROS y endometrio

La expresión de las isoformas endotelial e inducible de la sintetasa de óxido nítrico (eNOS y iNOS) ha sido puesta de manifiesto en el endometrio humano (Tseng et al., 1996) y en los vasos sanguíneos endometriales (Taguchi et al., 2000). La isoforma eNOS, originalmente identificada en los vasos endoteliales, también se encuentra en las células epiteliales glandulares superficiales del endometrio humano. El óxido nítrico parece regular también la microvasculatura del endometrio y jugar un papel importante en el proceso de la menstruación. La expresión de mRNA de eNOS ha sido detectada en las fases endometriales secretora media y tardía, sugiriendo que pueda jugar

un papel importante en la deciduación del endometrio. Los ROS producen cambios en el endometrio que conducen a su preparación para la implantación.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aitken J, Krausz C, Buckingham D.:** Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev*, 1994; 39: 268-79.
2. **Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS.:** Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic Biol Med*, 1996; 21: 495-504.
3. **Aitken RJ, Clarkson JS.:** Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1987; 8: 459-69.
4. **Aitken RJ and Clarkson JS.:** Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J androl.*, 1988; 9: 367-376.
5. **Aitken RJ.:** A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*, 1994; 6: 19-23.
6. **Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D et al.:** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1998; 59: 1037-1046.
7. **Allani PK, Sum T, Bhansali SG, Mukherjee SK, Sonee M.:** A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004; 196: 29-36.
8. **Álvarez JG.:** DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol*, 2003; 55: 233-9.
9. **Álvarez JG and Storey BT.:** Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biol Reprod*, 1984b; 30: 323-32.
10. **Álvarez JG and Storey BT.:** Differential Incorporation of Fatty Acids into and Peroxidative Loss of Fatty Acids from Phospholipids of Human Spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1995; 42: 334-46.
11. **Álvarez JG and Storey BT.:** Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod*, 1984a; 30: 833-41.
12. **Álvarez JG and Storey BT.:** Role of Glutathione Peroxidase in Protecting Mammalian Spermatozoa From Loss of Motility Caused by Spontaneous Lipid Peroxidation. *Gamete Res*, 1989; 23: 77-90.
13. **Álvarez JG and Storey BT.:** Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod*, 1982; 27: 1102-08.
14. **Álvarez JG and Storey BT.:** Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa. Dependence of rate on temperature and oxygen concentration. *Biol Reprod*, 1985; 32: 342-51.
15. **Álvarez JG, and Storey BT.:** Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biol Reprod*, 1983; 28: 1129-36.
16. **Álvarez JG, Ollero M, Larson-Cook KL, Evenson DP.:** Selecting cryopreserved semen for assisted reproductive techniques based on the level of sperm nuclear DNA fragmentation resulted in pregnancy. *Fertil Steril*, 2004; 81: 712-3.
17. **Álvarez JG, Sharma RK, Ollero M, López MC, Saleh RA, Thomas A, Evenson DP and Agarwal A.:** Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril*, 2002; 78: 319-29.
18. **Álvarez JG, Touchstone JC, Blasco, L, Storey BT.:** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*, 1987; 8: 338-48.
19. **Aruoma OI, Halliwell B.:** The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica*, 1988; 18: 459-70.
20. **Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A.:** Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000; 294: 997-1008.
21. **Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT.:** Impact of mild scrotal heat on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction*, 2005; 129: 505-14.
22. **Bedford JM, Bent MJ and Calvin H.:** Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1973; 33: 19-29.
23. **Britan A, Maffre V, Tone S, Drevet JR.:** Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res*, 2006; 2: 1-10.
24. **Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E.:** Oxygen, early embryonic metabolism and free radical mediated embryopathies. *Hum Reprod.*, 2003; 6: 84-96.
25. **Cohen PE, Pollard JW.:** Cytokines and growth factors in reproduction. In: Bronson R, eds. *Reproductive Immunology*. Cambridge, MA. Blackwell Science, 1995.
26. **Cui J, Holmes EH, Green TG, Liu PK.:** Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J*, 2000; 14: 955-967.

27. **Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE.:** Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril*, 2004; 82: 1443-5.
28. **de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM.:** Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod.*, 2003; 68: 2122-34.
29. **Evenson DP.:** Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev*, 1999; 11: 1-15.
30. **Galmes IB and Nistal MM.:** Partial obstruction of the seminal path, a frequent cause of oligozoospermia in men. *Hum Reprod*, 1998; 13: 3402-5.
31. **Gil-Guzman E, Ollero M, López MC, Sharma RK, Agarwal A, and Álvarez JG.:** Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*, 2001; 16: 1922-30.
32. **Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, and Tesarik J.:** Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 2005; 20: 226-230.
33. **Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D.:** Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reprod Fertil*, 1995; 103: 17-26.
34. **Guerin P, El Moutassim S, Menezo Y.:** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 2001; 7: 175-189.
35. **Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG.:** Redox regulation of early embryo development. *Reproduction*, 2002; 123: 479-486.
36. **Holland MK, Álvarez JG, and Storey BT.:** Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*, 1982; 27: 1109-1118.
37. **Il'yasova D, Morrow JD, Ivanova A, Wagenknecht LE.:** Epidemiological marker for oxidant status: comparison of the ELISA and the gas chromatography/mass spectrometry assay for urine 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-isoprostane. *Ann Epidemiol*, 2004; 14: 793-7.
38. **Jeulin C, Aerres HB and Jouannet P.:** The effects of centrifugation, various synthetic media and temperature on the motility and vitality of human spermatozoa. *Reprod. Nutr. Develop*, 1982; 22: 81-91.
39. **Jow WW, Schlegel PN, Cichon Z, Phillips D, Goldstein M, Bardin CW.:** Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *J Androl*, 1993; 14: 439-47.
40. **Kurzawa R, Barcew-Wiszniewska B, Skowron J.:** Rat epididymal epithelial cells produce nitric oxide upon concomitant lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulation. *Folia Histochem Cytobiol*, 1996; 34 Suppl 1: 85-6.
41. **Lopes S, Jurisicova A, Sun JG et al.:** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1998; 13: 896-900.
42. **Maas DH, Storey BT, Mastroianni L.:** Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril*, 1976; 27: 1312-17.
43. **Montag M, van der Ven H, Haidl G.:** Recovery of ejaculated spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection after anti-inflammatory treatment of an azoospermic patient with genital tract infection: a case report. *Andrologia*, 1999; 31: 179-81.
44. **Morrow JD, Roberts LJ 2nd.:** Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol*, 1999; 300: 3-12.
45. **Mortimer D.:** Sperm preparation methods. *J Androl.*, 2000; 21: 357-366.
46. **Mortimer D.:** Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod.*, 1991; 6: 173-176.
47. **Moskovitz B, Lin R, Nassar S, Levin DR.:** Effect of diclofenac sodium (Voltaren) on spermatogenesis of infertile oligospermic patients. *Eur Urol*, 1988; 14: 395-7.
48. **Mouithys-Mickalad AM, Zheng SX, Deby-Dupont GP, Deby CM, Lamy MM, Reginster JY, Henrotin YE.:** In vitro study of the antioxidant properties of non steroidal anti-inflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin resonance (ESR). *Free Radic Res*, 2000; 33: 607-21.
49. **O'Bryan MK, Schlatt S, Gerdprasert O, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP.:** Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biol Reprod*. 2000; 63: 1285-93.
50. **Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G.:** Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, 1995; 12: 41-7.
51. **Ollero M, Guzman-Gil E, López MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson DK, Thomas Jr. A, and Álvarez JG.:** Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*, 2001; 16: 1912-21.
52. **Ollero M, Powers DP, and Álvarez JG.:** Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Mol Reprod Dev*, 2000; 55: 326-34.

53. **Orozco TJ, Wang JF, Keen CL.:** Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem*, 2003; 14: 104-10.
54. **Ramsey KH, Sigar IM, Rana SV, Gupta J, Holland SM, Byrne GI, Morrow JD.:** Inducible nitric oxide synthase regulates production of isoprostanes in vivo during chlamydial genital infection in mice. *Infect Immun*, 2003; 71: 7183-7.
55. **Reinhardt A, Haidl G, Schill WB.:** Granulocyte elastase indicates silent male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment. *Andrologia.*, 1997; 29: 187-92.
56. **Romeo C, Ientile R, Santoro G, Impellizzeri P, Turiaco N, Impala P, Cifala S, Cutroneo G, Trimarchi F, Gentile C.:** Nitric oxide production is increased in the spermatic veins of adolescents with left idiopathic varicocele. *J Pediatr Surg*, 2001; 36: 389-93.
57. **Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG.:** Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, 2002a; 78: 1215-24.
58. **Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Álvarez JG, Thomas AJ Jr, Sharma RK.:** Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*, 2002b; 78: 313-8.
59. **Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Belau G.:** Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod*, 2005; 20: 3446-51.
60. **Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, Castro A.:** Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod*, 2006; 21: 986-993.
61. **Steele EK, McClure N, Maxwell RJ, Lewis SE.:** A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*, 1999; 5: 831-5.
62. **Storey BT, Álvarez JG, Thompson K.:** Human Sperm Glutathione Reductase Activity in Situ Reveals Limitation in the Glutathione Antioxidant Defense System Due to Supply of NADPH. *Mol Reprod Dev*, 1998; 49: 400-7.
63. **Suganuma R, Yanagimachi R, Meistrich M.:** Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum Reprod*, 2005; 20: 3101-08.
64. **Taguchi M, Alfer J, Chwalisz K et al.:** Endothelial nitric oxide synthase is differentially expressed in human endometrial vessels during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*, 2000; 6: 185-190.
65. **Travis AJ, Tutuncu L, Jorgez CJ, Ord TS, Jones BH, Kopf GS, Williams CJ.:** Requirements for glucose beyond sperm capacitation during in vitro fertilization in the mouse. *Biol Reprod.*, 2004; 71: 139-45.
66. **Tseng L, Zhang J, Peresleni T, et al.:** Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glans of human endometrium. *J of Soc Gynecol Inv*, 1996; 3: 33-38.
67. **Twigg JP, Irvine DS and Aitken RJ.:** Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1998b; 13: 1864-1871.
68. **Wiszniewska B, Kurzawa R, Ciechanowicz A, Machalinski B.:** Inducible nitric oxide synthase in the epithelial epididymal cells of the rat. *Reprod Fertil Dev*, 1997; 9: 789-94.
69. **Zini A, Buckspan M, Jamal M, Jarvi K.:** Effect of varicolectomy on the abnormal retention of residual cytoplasm by human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1999; 14: 1791-3.
70. **Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN.:** Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod*, 1996; 55: 935-41.
71. **Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H.:** Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Hum Reprod.*, 2000; 15: 1978-84.

Predicción de la respuesta ovárica en ciclos de fecundación asistida

Juan Balasch, Joana Peñarrubia

Institut Clínic de Ginecología, Obstetricia y Neonatología, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina-Universidad de Barcelona. C/Casanova 143, 08036-Barcelona.

INTRODUCCIÓN. LA NECESIDAD DE PREDECIR LA RESPUESTA OVÁRICA EN LOS CICLOS DE FECUNDACIÓN ASISTIDA

La capacidad de los ovarios para responder al estímulo gonadotrófico mediante el reclutamiento de una cohorte de folículos es esencial para el éxito de los tratamientos de fecundación in vitro (FIV). El grado de respuesta ovárica alcanzado como respuesta al tratamiento gonadotrófico es un reflejo directo del potencial ovárico y define la denominada "reserva ovárica" que está en función del tamaño del "pool" residual de folículos primordiales existentes en los ovarios.

La disminución progresiva del número de folículos primordiales es un hecho inherente al paso de los años y a la reducción de la fertilidad de la mujer (Balasch, 2000). Así, durante la vida intrauterina existe en el embrión una fase de gónada indiferenciada, siendo el primer signo de diferenciación ovárica la entrada en rápida multiplicación mitótica de las células germinales, entre las semanas 6 y 8 de embarazo. De esta manera, mientras en el ovario embrionario de 30 días sólo hay unas 2.000 células germinales, hacia la semana 20 se alcanza el máximo, existiendo en el ovario fetal de 6 a 7 millones de células germinales rodeadas por una capa unicelular de

células procedentes de los cordones sexuales (células de la pregranulosa). En esta época de la gestación, las oogonias entran en meiosis, meiosis que se detendrá en el estadio de diplotene de la profase, al mismo tiempo que se inicia un proceso de atresia folicular que determina que al nacimiento de la niña existan en los ovarios menos de un millón de folículos primordiales, y entre 200.000 y 300.000 en la pubertad.

Esta depleción germinal de la gónada continúa a lo largo de la vida reproductiva de la mujer y se acelera especialmente en los 10 años previos a la menopausia de manera que hacia los 50 años de edad las reservas foliculares están prácticamente exhaustas, calculándose que el número de folículos primordiales en aquel momento no es superior a 1000 (Speroff et al., 1989; Faddy y cols., 1992; Faddy y Gosden, 1996).

Es importante destacar que si bien es lógico que exista un paralelismo entre el aumento de la edad cronológica de la mujer y la reducción de la fertilidad femenina, lo cierto es que la reserva ovárica (definida como la capacidad de los ovarios para responder al estímulo gonadotrófico con un desarrollo folicular adecuado) también disminuye lógicamente con la edad, pero se trata esencialmente de una función biológica más que cronológica y por tanto el momento de inicio de la disminución de la reserva ovárica es altamente variable. En otras palabras, existe no con poca frecuencia una discrepancia entre la edad cronológica de la mujer y la denominada "edad biológica o gonadal" (Thatcher y Naftolin, 1991; Scott y Hofmann, 1995; Barri et al., 1998; Bukman y Heineman, 2001; Klein y Sauer, 2001; Kligman y Rosenwaks, 2001; Akande y cols., 2002, 2004; van der Spuy y Alberts, 2002; Lockwood, 2004). Por tanto, si bien la existencia de una respuesta ovárica insuficiente al estímulo gonadotrófico ("baja respuesta") es esperable que sea el

Correspondencia: Dr. D. Juan Balasch
Institut Clínic de Ginecología y Obstetricia
Hospital Clínic, C/ Casanova 143
08036-Barcelona
e-mail: jbalasch@ub.edu

reflejo de una disminución del potencial reproductivo relacionado con la edad de la mujer, se conoce ya desde hace tiempo que el mismo fenómeno puede observarse en mujeres jóvenes (Jacobs y cols., 1990; Scott y Hofmann, 1995).

De todo ello se deriva el interés de poder predecir en lo posible la respuesta ovárica en las pacientes candidatas a tratamientos de fecundación asistida.

TESTS PROPUESTOS PARA EL ESTUDIO DE LA RESERVA OVÁRICA Y PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTÍMULO GONADOTRÓFICO EN LOS CICLOS DE FECUNDACIÓN ASISTIDA. SUS BASES BIOLÓGICAS

En la Tabla 1 se resumen los tests de reserva ovárica propuestos en la literatura. La reducción de la fertilidad con la edad de la mujer, especialmente a partir de los 35 años y mucho más aún a partir de los 40, es un hecho bien conocido y que va ligado al proceso biológico del envejecimiento.

Tabla 1
Tests de reserva ovárica

- Edad de la mujer
- Tests hormonales basales (día 3 del ciclo)
 - FSH -LH -FSH/LH
 - E₂ -Inhibinas (Inmunoreactiva, B)
 - Hormona anti-mülleriana
 - GnSAF (“Gonadotropin surge-attenuating factor”)
- Tests dinámicos
 - Clomifeno
 - Agonistas de la GnRH
 - Gonadotrofinas exógenas (FSH, HMG)
 - Hiperestimulación ovárica controlada (días 4-5)
- Ecografía
 - Volumen ovárico
 - Recuento de folículos antrales
 - Flujo vascular ovárico (estromal, folicular)
- Biopsia ovárica (densidad folicular)

La progresiva despoblación germinal de la gonada a la que nos hemos referido en el apartado anterior constituiría el sustrato biológico para el empleo del recuento de folículos antrales, o incluso de la biopsia ovárica (densidad folicular) propuesta por algunos, en la predicción de la respuesta ovárica.

Con el objetivo de mejorar la capacidad predictiva de la edad de la mujer y dada la frecuente discrepancia entre edad cronológica y edad biológica, se han empleado diferentes marcadores hormonales como posibles predictores en base a los cambios endocrinos progresivos que se asocian a la involución funcional ovárica con el avance de los años de vida reproductiva. En principio, parecería razonable pensar que al ir aumentando la edad de la mujer y al acercarse la perimenopausia y la menopausia, y de forma concomitante con la reducción del “pool” folicular ovárico que hemos dicho anteriormente que se produce, tendría que haber una reducción en los niveles séricos de estradiol que se acompañaría de un aumento en los niveles de hormona folículoestimulante (FSH). Sin embargo, esta supuesta correlación endocrinológica no es así ya que la mayor parte del estradiol circulante en la mujer en edad reproductiva está producido por el folículo preovulatorio y en tanto en cuanto exista desarrollo folicular, los niveles de estradiol en la mujer de edad reproductiva avanzada no son significativamente diferentes de los observados en mujeres más jóvenes (Thatcher y Naftolin, 1991; Soules y cols., 2000). Los folículos más pequeños producen tan sólo una parte muy pequeña del estradiol circulante y por tanto la disminución de este “pool” folicular ovárico tiene un escaso reflejo en la producción estrogénica del ciclo ovulatorio independientemente de la edad de la mujer. Por ello, desde hace tiempo se conoce que la disminución del estradiol no constituye la explicación al aumento de los niveles de FSH asociado al incremento de la edad en las mujeres que conservan su función ovárica (Sherman y cols., 1976).

Hoy está bien establecido que el selectivo incremento de los niveles circulantes de FSH asociado al aumento de la edad a lo largo de los años de funcionalismo ovárico en la mujer, se debe a la reducción en la producción de inhibinas por parte del ovario (Hughes y cols., 1990; Buckler y cols., 1991; Pellicer y cols., 1994; Lockwood, 2004; The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2002, 2004) que se explica no sólo por una reducción en la población folicular, sino también por una disminución del funcionalismo celular de la granulosa (Pellicer y cols., 1994). Un hecho importante a favor de que este incremento de la FSH está relacionado con la disminución en la producción de inhibinas, es precisamente que sea selectivo para esta gonadotrofina y no se acompañe por tanto en un principio de un incremento en los niveles de hormona luteinizante (LH) tal como ya establecieron estudios iniciales sobre el tema (Sherman y cols., 1976; Reyes y cols., 1977; Musey y cols., 1987). Por otra parte, el incre-

mento de los niveles séricos de FSH es más evidente al inicio de la fase folicular y ello se asocia a una discreta elevación en los niveles de estradiol (Reyes y cols., 1977; Musey cols., 1987; Thatcher y Naftolin, 1991).

Por tanto, estos hallazgos endocrinos que caracterizan la fase folicular precoz a medida que aumenta la edad reproductiva de la mujer, son claramente consistentes con una mayor estimulación tónica del "pool" de folículos ováricos más pequeños. El incremento en la tasa de gemelos dizigóticos (y no monozigóticos) que se sabe que existe con el aumento de la edad de la mujer, se ha atribuido desde hace tiempo a este mayor estímulo tónico de los ovarios por parte de la FSH (Bulmer, 1970; Thatcher y Naftolin, 1991). En mujeres sometidas a inducción de la ovulación, se ha descrito que basta una desviación del 10% en los niveles de FSH para que se altere el número de folículos que ovulan en un mismo ciclo (Brown, 1978).

Es importante destacar que la elevación de los niveles de FSH puede alterar no sólo el número de folículos destinados a ovular sino también la velocidad del crecimiento folicular. Así, a medida que se acerca la menopausia de la mujer, la duración de los ciclos menstruales puede alargarse debido a la existencia de anovulación, pero la correspondencia clínica de aquella característica endocrinológica (elevación de la FSH) suele ser el acortamiento de la duración del ciclo, hecho que se considera como el primer marcador clínico de perimenopausia (Balasch, 1991). Así, diferentes estudios han evidenciado este acortamiento de la duración del ciclo en la mujer de edad genésica avanzada (Sherman y Korenman, 1975; Sherman y cols., 1976; Reyes y cols., 1977; Metcalf y Livesey, 1985). Las razones para este acortamiento del ciclo puede ser lógicamente la existencia de una insuficiencia luteínica, pero el cambio funcional ovárico más característico resultante de este reajuste endocrino existente con la edad, es el acortamiento de la fase folicular debido a un desarrollo folicular acelerado y una ovulación precoz en comparación con el ciclo normal (Thatcher y Naftolin, 1991; Lockwood, 2004). Así por ejemplo, se ha demostrado que las mujeres de edad reproductiva avanzada que conservan ciclos ovulatorios, tienen una elevación monotrópica de los niveles de FSH sin cambio alguno en la bioactividad de la molécula de FSH o de la pulsatilidad de la GnRH (Klein y cols., 1996). En estas mujeres se comprueba un incremento más precoz de la elevación interciclo de la FSH, un acortamiento de la duración de la fase folicular asociado a un reclutamiento más precoz del folículo dominante, y una elevación más precoz también de los niveles séricos de estradiol (Klein y cols., 1996).

En esta última década, diferentes estudios han establecido de manera más definitiva el papel capital de las inhibinas que postulaban las investigaciones iniciales mencionadas antes en todo este complejo proceso de remodelado funcional ovárico asociado a la edad (Burger y cols., 1995; Ala-Fossi y cols., 1998; Reame y cols., 1998; Soules y cols., 1998; Santoro y cols., 1999; Welt y cols., 1999). Además, hemos asistido al desarrollo de inmunoanálisis capaces de diferenciar las diferentes formas moleculares que constituyen las familias de las inhibinas (Groome y cols., 1994, 1996).

Las inhibinas son glicoproteínas heterodiméricas producidas por las células de Sertoli del testículo y por las células de la granulosa y de la teca del ovario, así como también, pero en menor proporción, por algunos tejidos extragonadales tales como la médula ósea, el cerebro, la hipófisis, el hígado y la suprarrenal. Se componen de una subunidad (unida por un puente disulfuro a una de las dos subunidades β , la subunidad βA para formar la inhibina A, o la subunidad βB para formar la inhibina B, formas aisladas ambas a partir del líquido folicular ovárico. Hoy sabemos que la inhibina A es producida esencialmente por el folículo maduro y por el cuerpo lúteo, mientras que la inhibina B la secretan básicamente los folículos ováricos pequeños en la primera mitad de la fase folicular. Pueden existir otras formas moleculares en la circulación, especialmente subunidades α libres y formas diméricas parciales $\alpha\beta$ que carecen, sin embargo, de actividad biológica (Balasch, 1999; Lockwood, 2004). Los estudios sobre la transición menopáusica mencionados antes (Burger y cols., 1995; Ala-Fossi y cols., 1998; Reame y cols., 1998; Soules y cols., 1998; Santoro y cols., 1999; Welt y cols., 1999) han establecido que el evento endocrino más significativo en las fases más iniciales de dicho período de transición, es una sustancial disminución de los niveles circulantes de inhibina B sin que existan por el contrario cambios tan marcados en los niveles de inhibina A o de estradiol. Todos estos cambios endocrinos que caracterizan el envejecimiento ovárico en la mujer en edad reproductiva se esquematizan en la Figura 1.

En base a la secuencia de eventos resumidos en la Figura 1 se establece el fundamento fisiopatológico para el empleo de la determinación en suero de los niveles de FSH, estradiol e inhibina B en fase folicular precoz (días 2-4 del ciclo menstrual, en general dentro de los 3 meses que preceden a la práctica de la fecundación asistida) como marcadores hormonales potencialmente capaces de predecir la respuesta ovárica.

En cuanto a la LH, ya hemos dicho antes que inicialmente no existe una elevación de sus niveles en

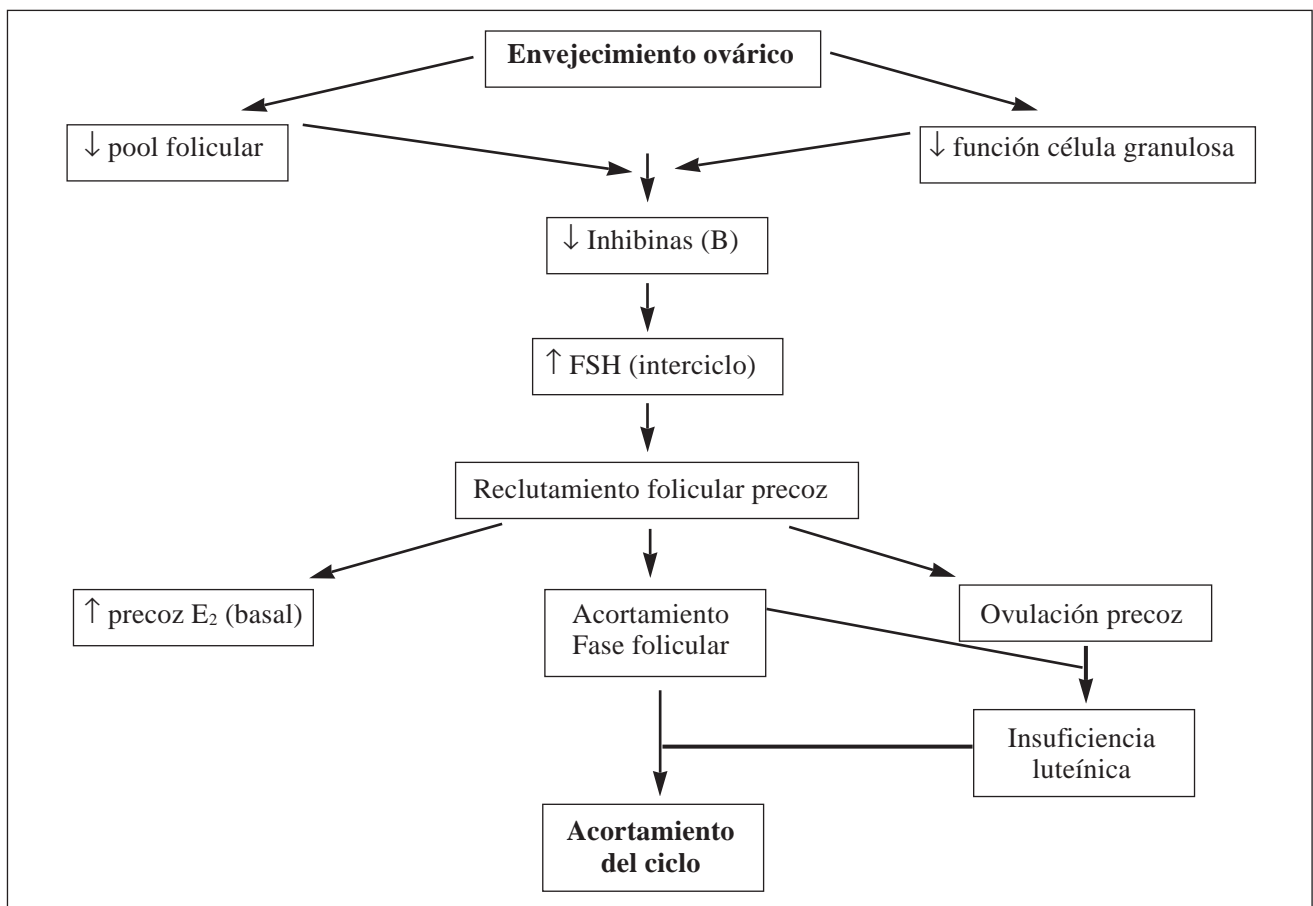


Figura 1

Diagrama de los cambios endocrinos asociados al envejecimiento ovárico en la mujer en edad reproductiva

suero acompañando a los de FSH como signo de envejecimiento ovárico (Sherman y cols., 1976; Reyes y cols., 1977; Musey y cols., 1987). Sin embargo, si bien de acuerdo con los conceptos más actuales sobre la regulación gonadotrófica del ciclo ovárico sabemos que la FSH es el elemento indispensable en la primera mitad de la fase folicular para que se produzca el reclutamiento adecuado de los folículos ováricos, también está ahora plenamente establecido que unos niveles mínimos de LH durante la primera mitad del ciclo son esenciales para un adecuado crecimiento y maduración del folículo(s) dominante(s) (Balasch y Fábregues, 2002; Balasch, 2004). En efecto, hacia la mitad de la fase folicular, cuando el folículo dominante alcanza unos 10 mm de diámetro ha adquirido ya receptores para la LH en la teca-granulosa gracias al influjo de la FSH, y a partir de este momento es susceptible de ser influido en su crecimiento por la LH (Hillier, 2001; Zeleznik, 2001). La LH juega un papel esencial entonces contribuyendo con la FSH al

crecimiento y desarrollo del folículo, es indispensable para la esteroidogénesis ovárica (“teoría de las dos células-dos gonadotropinas”: la LH estimula la producción androgénica en la teca, andrógenos que son aromatizados a estrógenos en la granulosa bajo la acción de la FSH), y sin la existencia de unos niveles suficientes de LH no se logra la maduración completa del folículo ni unos ovocitos capaces de ser fertilizados normalmente (Balasch y cols., 1995; Fox y cols., 1997; Cortvrindt y cols., 1998; Sullivan y cols., 1999).

Dado este papel esencial de la LH en el crecimiento y maduración del folículo en la segunda mitad de la fase folicular, se ha planteado recientemente la posibilidad de que exista un déficit de esta gonadotropina en las pacientes sometidas a fecundación asistida bajo supresión hipofisaria con agonistas de la GnRH, lo que comportaría una disminución de la respuesta ovárica en forma de una disminución de la síntesis normal de estradiol, de las tasas de fertilización y de los resultados clínicos finales de la técnica en forma

de un incremento significativo de las pérdidas embrionarias precoces (Westergaard y cols., 1996, 2000; Fleming y cols., 1998, 2000; Filicori, 1999; Janssens y cols., 2000). La potencial relevancia de esta observación se comprende teniendo en cuenta la generalización en el uso de la supresión hipofisaria para la estimulación ovárica en las pacientes de fecundación asistida a la que hemos asistido a lo largo de los últimos 15 años y a la más reciente disponibilidad de la FSH recombinante como preparado monohormonal totalmente puro utilizado para la estimulación ovárica en dichas pacientes.

Téngase en cuenta, además, que durante la estimulación ovárica los niveles de LH endógena pueden disminuir incluso más en relación a los observados tras la supresión hipofisaria debido al efecto de feedback negativo que las inhibinas y el estradiol producidos por los folículos en crecimiento tienen sobre la hipófisis. Por todo ello, ha surgido recientemente un gran interés acerca de los niveles séricos de LH durante la fase folicular de los ciclos de fecundación asistida en mujeres sometidas a supresión hipofisaria como potenciales marcadores de respuesta ovárica, ya que ello puede tener implicaciones clínico-prácticas en relación al tipo más adecuado de gonadotropina (FSH sola o asociada a actividad LH) a administrar (Balasch y Fábregues, 2002; Balasch, 2004). A todo esto hay que añadir que dos estudios muy recientes (Marrs y cols., 2004; Humaidan y cols., 2004) sugieren que la existencia de este déficit endógeno de LH se daría especialmente en mujeres de más de 35 años de edad, lo que conferiría más valor aún a la determinación de esta hormona como marcador de reserva ovárica.

Además de la FSH, el estradiol, las inhibinas y la LH, recientemente se ha propuesto en la literatura la determinación de los niveles séricos de la hormona antimülleriana (AMH) como marcador hormonal de envejecimiento ovárico y por tanto potencialmente útil para evaluar la reserva ovárica (de Vet y cols., 2002; van Rooij y cols., 2003; Fanchin y cols., 2003). La AMH es un componente de la familia de los factores de diferenciación y crecimiento tipo “ β -transforming growth factors” (factores de crecimiento transformante tipo β) que fue identificada inicialmente como el factor producido por las células de Sertoli testiculares que induce la regresión de los conductos de Müller durante el desarrollo fetal masculino. En la hembra la AMH se expresa sólo en el ovario y tiene dos importantes funciones durante la foliculogénesis: inhibe el reclutamiento de folículos antrales a partir del pool folicular ovárico y reduce la sensibilidad folicular a la acción de la FSH (Grujters y cols., 2003).

Por ello, el posible valor de la AMH como marcador de reserva ovárica en los ciclos de fecundación asistida ha sido también objeto de estudio en nuestras investigaciones junto con los otros marcadores hormonales mencionados antes (FSH, estradiol, inhibinas, LH).

Dado que los niveles séricos de todos estos marcadores pueden modificarse durante la estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas y dada la gran variabilidad de respuesta folicular ovárica individual al tratamiento gonadotrófico que existe incluso en mujeres con ciclos regulares, normogonadales y normogonadotrópicas (Wallach, 1995; Farhi y cols., 1997), resulta de interés la investigación de dichos marcadores hormonales no sólo en condiciones basales (en general, días 2-4 de un ciclo menstrual espontáneo en los 3 meses previos a la fecundación asistida) sino también mediante los denominados tests dinámicos de estudio de la reserva ovárica o durante la propia estimulación ovárica como forma de test dinámico más directo. La disponibilidad de marcadores de baja respuesta ovárica al inicio (días 4-5 de estimulación, tras 3-4 días de terapéutica gonadotrófica) del propio ciclo de estimulación para fecundación asistida, podría permitir cancelar precozmente ciclos condenados al fracaso y evitar estimulaciones ováricas prolongadas innecesarias o intentar reconducir de forma precoz el tratamiento efectuado para intentar rescatar el ciclo. De hecho, se ha sugerido recientemente que la única evidencia definitiva de que una paciente es baja respondedora, es seguramente la estimulación ovárica para FIV (Karande y Gleicher, 1999; Tarlatzis y cols., 2003), aún cuando no existían hasta hace poco estudios previos que avalasen esta afirmación científicamente. Por ello, nosotros hemos investigado también el valor de un ciclo previo cancelado de FIV como predictor de la respuesta ovárica en ciclos ulteriores.

RESUMEN DE NUESTROS ESTUDIOS SOBRE PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA OVÁRICA EN CICLOS DE FECUNDACIÓN ASISTIDA

Desde 1996 en que publicamos nuestro primer estudio sobre el tema (Balasch y cols., 1996), nuestro grupo ha estado interesado en el análisis de posibles marcadores para predecir la respuesta ovárica en los ciclos de fecundación asistida. Nuestras investigaciones se han centrado fundamentalmente en el estudio de la edad de la mujer versus marcadores hormonales tales como la FSH, la LH, el estradiol, las

inhibinas (inmunoreactiva [Ir], inhibina A, inhibina B), y la hormona antimülleriana (Balasch y cols., 1996, 2001; Creus y cols., 2000; Fábregues y cols., 2000; Peñarrubia y cols., 2000, 2003, 2005a, 2005b). Más recientemente hemos incorporado también el recuento de folículos antrales y la medición del volumen ovárico en condiciones basales como predictores de respuesta ovárica y embarazo en ciclos de FIV.

En estos estudios se ha analizado la precisión diagnóstica de la edad de la mujer y de estos diferentes marcadores hormonales en cuanto a la respuesta ovárica (cancelación versus no cancelación) al estímulo gonadotrófico en los ciclos de fecundación asistida. Ello se ha llevado a cabo tanto para los marcadores hormonales en condiciones basales (determinaciones en los días 2º-4º de un ciclo menstrual espontáneo dentro de los 3 meses que preceden al ciclo de fecundación asistida) como tras estimulación de los ovarios con gonadotrofinas (en un ciclo previo al de la FIV o en el día 5º de estimulación del propio ciclo de fecundación asistida). Por otra parte, dado que si bien el objetivo inicial de la determinación de estos marcadores hormonales es la predicción de la respuesta ovárica, teniendo en cuenta que grandes estudios que incluyen más de 35.000 ciclos de fecundación asistida han establecido que el factor más importante asociado al embarazo es el número de ovocitos obtenidos en cada ciclo (Templeton y Morris, 1998; Schieve y cols., 1999), y que desde el punto de vista tanto clínico-médico como social el logro de un embarazo es el objetivo final de las técnicas de fecundación asistida, es lógico que la capacidad predictiva de los marcadores de reserva ovárica en cuanto al embarazo sea también motivo de investigación.

El diseño de nuestros estudios ha sido la mayoría de veces del tipo casos y controles (Balasch y cols., 1996, 2001; Creus y cols., 2000; Peñarrubia y cols., 2000, 2005a, 2005b) en los que se seleccionaron una serie consecutiva de pacientes con ciclos cancelados debido a una insuficiente respuesta ovárica al tratamiento con gonadotrofinas y se compararon con un grupo control constituido por cada ciclo de fecundación asistida de nuestro programa que se realizó inmediatamente después de cada uno de los ciclos cancelados y en el que se llegó a la aspiración folicular. En los otros dos estudios se investigó una cohorte de pacientes consecutivas sometidas a fecundación asistida (Fabregues y cols., 2000; Peñarrubia y cols., 2003). Para evitar sesgos en los resultados obtenidos debido a la experiencia de tratamiento de la paciente en ciclos previos de estimulación ovárica para fecundación asistida, en todos estos estudios se incluyeron tan sólo mujeres que realizaban su primer ciclo de

FIV. Las pacientes fueron estimuladas siempre con un preparado de FSH (recombinante desde su introducción en la farmacopea española) bajo supresión hipofisaria con protocolo largo de leuprolide o triptorelina administrados en dosis diarias por vía s.c. La dosis diaria del agonista se redujo a la mitad tras obtenerse la supresión hipofisaria. Los criterios para la inyección de la HCG previa a la aspiración folicular fueron la presencia de 2 ó más folículos ≥ 18 mm de diámetro, con ≥ 4 folículos de ≥ 14 mm y unos niveles de estradiol en suero con un perfil de ascenso adecuado. El ciclo se canceló cuando había <3 folículos de diámetro ≥ 14 mm tras 8-9 días de tratamiento con gonadotrofinas o tras 4-5 días adicionales de estimulación ovárica sin que se alcanzasen, o sin perspectivas de alcanzar, los criterios de administración de la HCG. Estos criterios de cancelación del ciclo han sido ampliamente utilizados en la literatura (Hanoch y cols., 1998; Hugues y cols., 1998; Surrey y cols., 1998; De Placido y cols., 2000; García-Velasco y cols., 2000; Bancsi y cols., 2002; El Toukhy y cols., 2002; Klinkert y cols., 2004).

Los resultados de nuestros estudios se resumen en las Tablas 2 y 3. Globalmente se observa que los marcadores hormonales basales son mejores predictores de la respuesta ovárica a la estimulación con gonadotrofinas en los ciclos de FIV que la edad de la mujer, pero la determinación de las hormonas el día 5º de la hiperestimulación ovárica controlada en el mismo ciclo de la FIV constituye un método predictivo de la respuesta ovárica superior a las determinaciones hormonales basales. El test de las HMG practicado en un ciclo previo a la FIV presenta una capacidad predictiva inferior a la de las hormonas medidas el día 5º de estimulación. Por otra parte el recuento de folículos antrales (pero no la medición del volumen ovárico) en condiciones basales es mejor predictor de la respuesta ovárica que las diferentes hormonas determinadas en fase folicular precoz (días 2º-4º del ciclo menstrual), pero no que las determinaciones hormonales en el día 5º de la hiperestimulación ovárica controlada del ciclo de FIV, siendo la medición de la inhibina B en dicho día el marcador con una mayor precisión diagnóstica de la cancelación versus no cancelación del ciclo (Tabla 2).

En mujeres con un ciclo previo de FIV cancelado por falta de respuesta a la estimulación ovárica con gonadotrofinas, la cancelación previa constituye un mejor predictor de cancelación en un ciclo ulterior de tratamiento que la edad de la mujer o la determinación de FSH basal y esto es cierto independientemente del nivel de la FSH basal (Peñarrubia y cols., 2005b).

Sin embargo, cuando lo que se analiza es la capacidad predictiva de los tests de reserva ovárica relativa a

Tabla 2
Capacidad predictiva de los tests de reserva ovárica relativa a la respuesta a las gonadotropinas (cancelación versus no cancelación) en FIV

Parámetro	Sensibilidad	Especificidad	Precisión diagnóstica ^{a)}
Edad	71,73	62,82	66,13
FSH basal	83	73	81,82
LH basal	40	85	73,8
E ₂ basal	72	32	72,73
Inhibina B basal	89	29	79,36
AMH basal	40	91,7	75
E ₂ día 5° estimulación	89	75	85,9
Inhibina A día 5° estimulación	87	81	85,9
Inhibina B día 5° estimulación	94	81	91,03
AMH día 5° estimulación	53	96	78,7
E ₂ post-HMG	78,6	80,4	79,7
Recuento folicular antral basal	66,7	91,2	85,3
Volumen ovárico	77,8	68,4	69,3

^{a)} Porcentaje de ciclos con predicción correcta del resultado

Tabla 3
Capacidad predictiva de los tests de reserva ovárica relativa a la consecución o no de embarazo en ciclos de FIV

Parámetro	Sensibilidad	Especificidad	Precisión diagnóstica ^{a)}
Edad	74,1	85,9	81,20
FSH basal	78	100	78,22
LH basal	70,8	55,2	62,3
E ₂ basal	77	22	77,9
Inhibina B basal	68	18	68,09
AMH basal	62,5	55,2	41,5
E ₂ día 5° estimulación	77	25	79,92
Inhibina A día 5° estimulación	77	50	79,18
Inhibina B día 5° estimulación	78	50	79,92
AMH día 5° estimulación	66,7	48,3	47,2
E ₂ post-HMG	100	29,4	39,2
Recuento folicular antral basal	77,3	42,9	56,1
Volumen ovárico	18,2	100	66,7

^{a)} Porcentaje de ciclos con predicción correcta del resultado

la consecución o no de embarazo en los ciclos de FIV, la edad resulta mejor predictor que cualquiera de los tests hormonales y que los parámetros ecográficos basales (recuento folicular y volumen ovárico) (Tabla 3).

Finalmente y en cuanto al potencial impacto de

los niveles endógenos de LH en fase folicular tanto sobre la respuesta ovárica como los resultados de la FIV, nuestros estudios en pacientes sometidas a estimulación ovárica con FSH recombinante bajo supresión hipofisaria para fecundación asistida (Balasch y

cols., 2001; Peñarrubia y cols., 2003) (uno de ellos de tipo caso-control con un total de 144 mujeres, y el otro estudio basado en una cohorte de 246 pacientes consecutivas) y en los que se investigó el potencial impacto de la hipótesis de la "LH baja" no sólo en fase folicular media, sino a lo largo de todo la fase de estimulación ovárica hasta el día de la inyección de la HCG, utilizando un método estadístico adecuado (curvas ROC) para el análisis de la capacidad de los niveles de LH para discriminar entre ciclos cancelados y no cancelados, ciclos de embarazo versus no embarazo, y entre ciclos con embarazo evolutivo versus ciclos con pérdidas embrionarias precoces, se concluye claramente que los niveles de LH durante la estimulación ovárica carecen de capacidad predictiva alguna sobre la respuesta ovárica y/o los resultados de la fecundación asistida.

CONCLUSIONES

1) En mujeres sometidas a su primer ciclo de FIV, los tests hormonales dinámicos de valoración de la reserva ovárica, especialmente la determinación en suero de la inhibina B el día 5º de la hiperestimulación ovárica controlada en el mismo ciclo de la FIV, presentan una capacidad predictiva de cancelación versus no cancelación del ciclo superior a la de los tests hormonales basales, y estos son a su vez mejores predictores que la edad de la mujer. El recuento folicular antral basal tiene una capacidad predictiva de la respuesta ovárica superior a la de las determinaciones hormonales basales, pero no supera a la determinación de hormonas el día 5º de estimulación.

2) La edad de la mujer constituye el mejor predictor de embarazo, superando tanto a los estudios hormonales basales y dinámicos como a los parámetros ecográficos basales.

3) Desde un punto de vista clínico-práctico, sin embargo, hay que tener en cuenta que las diferencias observadas entre la capacidad predictiva de los diferentes marcadores es en muchos casos pequeña y por tanto hay que considerar tanto criterios de costo-eficacia, como de comodidad de la paciente y de disponibilidad de la(s) técnica(s). Por otra parte, no existen para ningún marcador "umbrales" válidos universalmente y es necesario por tanto establecer las "normalidades" en cada población o programa de fecundación asistida. Asimismo, dado que ningún test tiene una sensibilidad y especificidad absolutas, excepto para valores muy extremos y en el contexto del perfil clínico de la paciente, resulta difícil excluir a una paciente de la posibilidad de intentar el tratamiento en

base a los resultados de un test. Esto viene apoyado por el hecho de que la cancelación de un primer ciclo de FIV por respuesta folicular insuficiente a la estimulación con gonadotrofinas, constituye un mejor predictor de la respuesta ovárica en ciclos subsiguientes que la edad de la mujer y la determinación de la FSH basal, y esto se cumple independientemente de los niveles basales de FSH. Por tanto, la información obtenida mediante los tests de reserva ovárica ha de servir para orientar a la mujer acerca de sus posibilidades individuales de concepción y ayudarla así a la toma de decisiones.

4) En pacientes sometidas a FIV y estimuladas con FSH recombinante bajo supresión hipofisaria con un análogo de la GnRH de potencia apropiada y de dosis diaria subcutánea, los niveles endógenos residuales de LH son suficientes para obtener una respuesta ovárica y unos resultados clínicos óptimos y carecen de capacidad predictiva alguna en este sentido.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado en parte con ayudas del Instituto de Salud Carlos III (RCMN C03/08) y la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-Generalitat de Catalunya (2005SGR00573).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Akande VA, Fleming CF, Hunt LP, Keay SD, Jenkins JM.**: Biological versus chronological ageing of oocytes, distinguishable by raised FSH levels in relation to the success of IVF treatment. *Hum Reprod*, 2002; 17: 2003-2008.
2. **Akande VA, Keay SD, Hunt LP, Mathur RS, Jenkins JM, Cahill DJ.**: The practical implications of a raised serum FSH and age on the risk of IVF treatment cancellation due to a poor ovarian response. *J Assist Reprod Genet*, 2004; 21: 257-262.
3. **Ala-Fossi SL, Maenpaa J, Blauer M, Aine R, Tuohimaa P, Punnonen R.**: Inhibin A and B in peri- and postmenopause. *Maturitas*, 1998; 30: 273-281.
4. **Balasch J.**: Cambios endocrinos en el climaterio y menopausia. *Rev Iberamer Fertil Reprod Hum*, 1991; 8: 9-13.
5. **Balasch J.**: La(s) inhibina(s) y la práctica clínica en obstetricia y ginecología. *Prog Obstet Ginecol*, 1999; 42: 699-702.
6. **Balasch J.**: Desarrollo folicular y ovulación. Regulación endocrina. En: Vanrell JA, Calaf J, Balasch J, Viscasillas P, eds. *Fertilidad y Esterilidad Humanas II. Endocrinología Ginecológica y Anticoncepción*. 2ª edición. Barcelona: Masson SA; 2000, pp. 33-46.

7. **Balasz J.:** The role of FSH and LH in ovulation induction: current concepts and the contribution of recombinant gonadotropins. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z ,eds. Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical Perspectives. 2nd edition. London: Taylor&Francis; 2004, pp. 541-565.
8. **Balasz J, Fábregues F.:** Is luteinizing hormone needed for optimal ovulation induction? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2002; 14: 265-274.
9. **Balasz J, Miró F, Burzaco I, Casamitjana R, Cívico S, Balleca JL, Puerto B, Vanrell JA.:** The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: evidence from in vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, 1995; 10: 1678-1683.
10. **Balasz J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Ascaso C, Vanrell JA.:** Inhibin, follicle stimulating hormone and age as predictors of ovarian response in in-vitro fertilization cycles stimulated with gonadotropin releasing hormone-agonist/gonadotropin treatment. *Am J Obstet Gynecol*, 1996; 175: 1226-1230.
11. **Balasz J, Vidal E, Peñarrubia J, Casamitjana R, Carmona F, Creus M, Fábregues F, Vanrell JA.:** Suppression of LH during ovarian stimulation: analysing threshold values and effects on ovarian response and the outcome of assisted reproduction in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 2001; 16: 1636-1643.
12. **Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, te Velde ER.:** Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 2003; 79: 1091-1100.
13. **Barri PN, Martínez F, Coroleu B, Parera N, Veiga A.:** Managing non-responders. *Fertility and Reproductive Medicine. Proceedings of XVI World Congress on Fertility and Sterility*; 1998, pp.127-137.
14. **Brown JB.:** Pituitary control of ovarian function - Concepts derived from gonadotrophin therapy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 1978; 18: 46-54.
15. **Buckler HM, Evans CA, Mamtora H, Burger HG, Anderson DC.:** Gonadotropin, steroid, and inhibin levels in women with incipient ovarian failure during anovulatory and ovulatory rebound cycles. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991; 72: 116-124.
16. **Bukman A, Heineman MJ.:** Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update*, 2001; 7: 581-590.
17. **Bulmer MG.:** The Biology of Twinning in Man. New York: Oxford University Press; 1970.
18. **Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Shelley JM, Green A, Smith A, Dennerstein L, Morse C.:** The endocrinology of the menopausal transition: a cross-sectional study of a population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80: 3537-3545.
19. **Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J.:** Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod*, 1998; 13: 1292-1302.
20. **Creus M, Peñarrubia J, Fábregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, Vanrell JA, Balasz J.:** Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod*, 2000; 15: 2341-2346.
21. **De Placido G, Alviggi C, Mollo A, Strina I, Varicchio MT, Molis M.:** Recombinant follicle stimulating hormone is effective in poor responders to highly purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, 2000; 15: 17-20.
22. **de Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC.:** Antimüllerian hormone serum levels : a putative maker for ovarian aging. *Fertil Steril*, 2002; 77: 357-362.
23. **El Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P.:** Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian response -an eighth year study. *Hum Reprod*, 2002; 17: 1519-1524.
24. **Fábregues F, Balasz J, Creus M, Carmona F, Puerto B, Quintó L, Casamitjana R, Vanrell JA.:** Ovarian reserve test with human menopausal gonadotropin as a predictor of in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet*, 2000; 17: 13-19.
25. **Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF.:** Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*, 1992; 7: 1342-1346.
26. **Faddy MJ, Gosden RG.:** A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod*, 1996; 11: 1484-1486.
27. **Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J.:** Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod*, 2003; 18: 323-327.
28. **Farhi J, Homburg R, Ferber A, Orvieto R, Ben-Rafael Z.:** Non-response to ovarian stimulation in normogonadotrophic, normogonadal women: a clinical sign of impending onset of ovarian failure pre-empting the rise in basal follicle stimulating hormone levels. *Hum Reprod*, 1997; 12: 241-243.
29. **Filicori M.:** The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril*, 1999; 71: 405-414.

30. **Fleming R, Lloyd F, Herbert M, Fenwick J, Griffiths T, Murdoch A.:** Effects of profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation on follicular activity, oocyte and embryo function in cycles stimulated with purified follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, 1998; 13: 1788-1792.
31. **Fleming R, Rehka P, Deshpande N, Jamieson ME, Yates RW, Lyall H.:** Suppression of LH during ovarian stimulation: effects differ in cycles stimulated with purified urinary FSH and recombinant FSH. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1440-1445.
32. **Fox R, Ekerona A, Wardle P.:** Ovarian response to purified FSH in infertile women with long-standing hypogonadotrophic hypogonadism. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*, 1997; 37: 92-94.
33. **García-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martínez-Salazar FJ, Landazábal A, Remohí J, Pellicer A, Simón C.:** High dose of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod*, 2000; 15: 2292-2296.
34. **Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganeson TS, Baird DT, McNeilly AS.:** Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol*, 1994; 40: 717-723.
35. **Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather J, McNeilly AS.:** Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81: 1401-1405.
36. **Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP.:** Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, 2003; 211: 85-90.
37. **Hanoch J, Lavy Y, Holzer H, Hurwitz A, Simon A, Revel A, Laufer N.:** Young low responders protected from untoward effects of reduced ovarian response. *Fertil Steril*, 1998; 69: 1001-1004.
38. **Hillier SG.:** Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, 2001; 179: 39-46.
39. **Hughes EG, Robertson DM, Handelsman DJ, Hayward S, Healy DL, de Kretser DM.:** Inhibin and estradiol responses to ovarian hyperstimulation: effects of age and predictive value for in vitro fertilization outcome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990; 70: 358-364.
40. **Hugues JN, Cedrin Durnerin I.:** Revisiting gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian response to gonadotrophins. *Hum Reprod Update*, 1998; 4: 83-101.
41. **Humaidan P, Bungum M, Bungum L, Yding Andersen C.:** Effects of recombinant LH supplementation in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and stimulation with recombinant FSH: an opening study. *Reprod Biomed Online*, 2004; 8: 635-643.
42. **Jacobs SL, Metzger DA, Dodson WC, Haney AF.:** Effect of age on response to human menopausal gonadotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990; 71: 1525-1530.
43. **Janssens RM, Lambalk CB, Vermeiden JP, Scahts R, Bernards JM, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J.:** Dose-finding study of triptorelin acetate for prevention of a premature LH surge in IVF: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Hum Reprod*, 2000; 15: 2333-2340.
44. **Karande V, Gleicher N.:** A rational approach to the management of low responders in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1999; 14: 1744-1748.
45. **Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR.:** Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81: 2742-2745.
46. **Klein J, Sauer MV.:** Assessing fertility in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 185: 758-770.
47. **Kligman I, Rosenwaks Z.:** Differentiating clinical profiles: predicting good responders, poor responders, and hyperresponders. *Fertil Steril*, 2001; 76: 1185-1190.
48. **Klinkert ER, Broekmans FJM, Looman CWN, te Velde ER.:** A poor response in the first in vitro fertilization cycles is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril*, 2004; 81: 1247-1253.
49. **Lockwood G.:** The diagnostic value of inhibin in infertility evaluation. *Sem Reprod Med*, 2004; 22: 195-208.
50. **Marrs R, Meldrum D, Muasher S, Schoolcraft W, werlin L, Kelly E.:** Randomized trial to compare the effect of recombinant human FSH (follitropin alfa) with or without recombinant human LH in women undergoing assisted reproduction treatment. *Reprod Biomed Online*, 2004; 8: 175-182.
51. **Metcalf MG, Livesey JH.:** Gonadotrophin excretion in fertile women: effect of age and the onset of the menopausal transition. *J Endocrinol*, 1985; 105: 357-362.
52. **Musey VC, Collins DC, Musey PI, Martino-Saltzman D, Preedy JR.:** Age-related changes in the female hormonal environment during reproductive life. *Am J Obstet Gynecol*, 1987; 157: 312-317.
53. **Pellicer A, Mari M, de los Santos MJ, Simón C, Remohi J, Tarin JJ.:** Effects of aging on the human ovary: the secretion of immunoreactive a-inhibin and progesterone. *Fertil Steril* 61: 663-668.

54. **Peñarrubia J, Balasch J, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Moreno V, Calafell JM, Vanrell JA.:** Day 5 inhibin B serum concentrations as predictors of assisted reproductive technology outcome in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1499-1504.
55. **Peñarrubia J, Fábregues F, Creus M, Manau D, Casamitjana R, Guimerá M, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J.:** LH serum levels during ovarian stimulation as predictors of ovarian response and assisted reproduction outcome in down-regulated women stimulated with recombinant FSH. *Hum Reprod*, 2003; 18: 2689-2697.
56. **Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R, Carmona F, Vanrell JA, Balasch J.:** Basal and stimulation day 5 anti-müllerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod*, 2005a; 20: 915-922.
57. **Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Carmona F, Casamitjana R, Vanrell JA, Balasch J.:** Previous cycle cancellation due to poor follicular development as a predictor of ovarian response in cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod*, 2005b; 20: 622-628.
58. **Reame NE, Wyman TL, Phillips DJ, de Kretser DM, Padmanabhan V.:** Net increase in stimulatory input resulting from a decrease in inhibin B and an increase in activin A may contribute in part to the rise in follicular phase follicle-stimulating hormone of aging cycling women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83: 3302-3307.
59. **Reyes FI, Winter JS, Faiman C.:** Pituitary-ovarian relationships preceding the menopause. I. A cross-sectional study of serum follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, estradiol and progesterone levels. *Am J Obstet Gynecol*, 1977; 129: 557-564.
60. **Santoro N, Tovagholi Adel BS, Skurnick JH.:** Decreased inhibin tone and increased activin A secretion characterize reproductive aging in women. *Fertil Steril*, 1999; 71: 658-662.
61. **Scott RT, Hofmann GE.:** Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 1995; 63: 1-11.
62. **Schieve LA, Peterson HB, Meikle SF, Jeng G, Danel I, Burnett NM, Wilcox LS.:** Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *JAMA*, 1999; 282:1832-1838.
63. **Sherman BM, Korenman SG.:** Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life. *J Clin Invest*, 1975; 55: 699-706.
64. **Sherman BM, West JH, Korenman SG.:** The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations during the menstrual cycle of older women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1976; 42: 629-636.
65. **Soules MR, Battaglia DE, Klein NA.:** Inhibins and reproductive aging in women. *Maturitas*, 1998; 30:193-204.
66. **Soules MR, Battaglia DE, Klein NA.:** The endocrinology of ovarian (reproductive) aging in women. In: Te Velde ER, Pearson PL, Broekmans FJ, eds. *Female Reproductive Aging*. New York: The Parthenon Publishing Group; 2000; pp. 79-100.
67. **Speroff L, Glass RH, Kase NG.:** *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 4th edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
68. **Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ.:** Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 228-232.
69. **Surrey ES, Bower JA, Hill DM, Ramsey J, Surrey MW.:** Clinical and endocrine effects of a microdose GnRH agonist flare regimen administered to poor responders who are undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1998; 69: 419-424.
70. **Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J.:** Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update*, 2003; 9: 61-76.
71. **Templeton A, Morris JK.:** Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 1998; 339: 573-577.
72. **Thatcher SS, Naftolin F.:** The aging and aged ovary. *Sem Reprod Endocrinol*, 1991; 9: 189-199.
73. **The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine:** Aging and infertility in women: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2002; 78: 215-219.
74. **The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine:** Aging and infertility in women. *Fertil Steril*, 2004; 82 (Suppl. 1):S102-S106.
75. **van der Spuy ZM, Alberts PJ.:** Ovarian reserve. In: Healy DL, Kovacs GT, McLachlan R, Rodriguez-Armas O, eds. *Reproductive Medicine in the Twenty-First Century*. New York: The Parthenon Publishing Group, 2002; pp. 295-305.
76. **van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER.:** Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2003; 79: 482-488.

77. **Wallach EE.:** Pitfalls in evaluating ovarian reserve. *Fertil Steril*, 1995; 63: 12-14.
78. **Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE.:** Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 105-111.
79. **Westergaard LG, Erb K, Lauersen S, Rasmussen PE, Rex S.:** The effect of human menopausal gonadotrophin and highly purified, urine-derived follicle stimulating hormone on the outcome of in-vitro fertilization in down-regulated normogonadotrophic women. *Hum Reprod*, 1996; 11: 1209-1213.
80. **Westergaard LG, Laursen SB, Andersen CY.:** Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in normogonadotrophic women undergoing assisted reproduction. *Hum Reprod*, 2000 15: 1003-1008.
81. **Zeleznik AJ.:** Follicle selection in primates: "Many are called but few are chosen". *Biol Reprod*, 2001; 65: 655-659.

Avances farmacológicos en el Tratamiento del Síndrome del Ovario Poliquístico

Alberto Romeu

Hospital "La Fe". Valencia

INTRODUCCIÓN

El síndrome del ovario poliquístico es un trastorno de etiología no conocida y de fisiopatología compleja, una de cuyas manifestaciones clínicas más importantes se deriva de la disfunción ovárica con que cursa, que se traduce en una anovulación crónica hiperandrogénica (1, 2).

Verosimilmente, es la consecuencia de una hiperestimulación crónica de la glándula, algo semejante a lo que ocurre con el tiroides en la enfermedad de Graves, a la que se puede llegar a través de distintas vías etiopatogénicas. Por esta razón, no existe la posibilidad de un tratamiento etiológico definido.

Se ha afirmado que todo se debe a un trastorno primitivamente ovárico (3-5) pero, de ser así, habría que aceptar que la disfunción ovárica es capaz de llegar a causar un trastorno generalizado. No debe ser así pero, mientras no se conozcan las claves genéticas no será posible definir una fisiopatología concreta. Mientras tanto, para los propósitos de esta presentación, basta con afirmar que el ovario poliquístico es el resultado de una hiperestimulación crónica de la teca y que la hiperproducción de andrógenos resultante es responsable de la disfunción de la granulosa (6).

Por alguna razón no bien conocida existe un aumento de la producción de andrógenos en la teca ovárica y éstos van a tener consecuencias importantes:

- Aumentar la producción extraglandular, periférica de estrógenos y, en consecuencia a niveles elevados y acíclicos de los mismos.
- Promover la aparición precoz de receptores de FSH en folículos preantrales y sensibilizar los mismos a la acción de esta hormona (3).

A nivel hipotalámico, el aumento de estrógenos aumenta la frecuencia y la amplitud de los pulsos de GnRH y, además, a nivel hipofisario, sensibiliza las células gonadotropas a la acción de esta neurohormona; como consecuencia de ello no sólo se produce más LH de lo normal en la hipófisis sino que, además, la aparición de receptores a LH en los folículos antrales (7) es precoz y se produce una androgenización de los mismos que conduce a la anovulación crónica (8).

En otras palabras, las mujeres con ovario poliquístico reclutan más folículos que las mujeres normales pero son incapaces de madurarlos correctamente (3, 4).

La anovulación crónica se traduce clínicamente en oligomenorrea y esterilidad y el hiperandrogenismo tiene como consecuencia que aparezcan síntomas cutáneos, como acné, seborrea e hirsutismo.

Con frecuencia variable, según las series y la metodología diagnóstica, el ovario poliquístico se asocia a obesidad y a hiperinsulinismo, secundario a un aumento de la resistencia a la acción periférica de la insulina (9). Ciertamente, la obesidad puede contribuir a agravar el hiperinsulinismo, incluso a provocarlo, pero no es menos cierto que, para que exista hiperinsulinismo, la obesidad no es una condición.

Desde el punto de vista del médico, distintos aspectos condicionan el tratamiento farmacológico del síndrome del ovario poliquístico:

- la falta de etiología conocida
- los aspectos conocidos de su fisiopatología
- su patocronia
- la disponibilidad de recursos

Otro importante condicionante del tratamiento farmacológico de esta enfermedad, la más común endocrinopatía de la mujer en edad fértil, es el deseo de la paciente afecta. Hasta tal punto que la pregunta a

formular cuando se llega al diagnóstico es ¿qué le preocupa? Porque la paciente puede desear un tratamiento estético, un tratamiento anticonceptivo, un hijo o la protección ante el componente metabólico que, muy probablemente, un día padecerá.

Se ha discutido, sin llegar a conclusiones, que la enfermedad poliquística del ovario reconoce un componente genético (10, 11), que puede originarse durante la vida fetal, etc pero esto no se traduce hasta la fecha en actitudes terapéuticas.

Lo que parece evidente es que el trastorno se inicia en la edad peripuberal, quizás durante la infancia (12, 13) y que, prácticamente siempre, desde el punto de vista de la ginecología, los trastornos menstruales, primera manifestación clínica, aparecen pronto después de la menarquia.

Así pues, desde el punto de vista del ginecólogo práctico, el primer síntoma clínico de la enfermedad es el trastorno del ciclo; el hiperandrogenismo cutáneo ha podido aparecer antes y ser un síntoma transitorio o permanente pero el acné o la pubarquia precoz pueden haber pasado desapercibidos, sobre todo debido a la presentación familiar del trastorno (no sorprenden a nadie) y porque son considerados como pequeñas variaciones de la normalidad.

Rara vez una niña prepúber consulta al ginecólogo por estar "llenita", tener acné o presentar la pubarquia de forma algo temprana. Sin embargo, los ginecólogos debemos llamar la atención de otros especialistas sobre este punto porque, quizá son el debut de lo que será más tarde un síndrome de ovario poliquístico.

De cualquier forma, la obesidad infantil hay que corregirla porque el 50% de las niñas obesas serán mujeres obesas y porque quizás un porcentaje no apreciable padecerá no sólo un SOP sino, también, un síndrome metabólico y un riesgo aumentado de padecer determinados tipos de cáncer hormono-dependiente (14, 15).

Resulta obvio señalar que, antes de iniciar cualquier tipo de tratamiento, el médico práctico deberá completar distintos objetivos:

- excluir la existencia de alteraciones endocrinas distintas de la disfunción esteroidea
- caracterizar correctamente a su paciente: conocer si presenta o no una secreción anormalmente elevada de insulina y si existe o no participación suprarrenal en el trastorno; valorar si presenta o no alteraciones del metabolismo de la glucosa o de los lípidos; valorar la presencia o no de criterios de riesgo vascular.
- Informar correctamente a su paciente y comentar con ella todos los aspectos de esta enfermedad

crónica y sus consecuencias a distintos niveles: reproductivo, metabólico y oncológico.

Las pacientes pueden solicitar tratamiento para corregir la obesidad, corregir el hiperandrogenismo cutáneo, corregir la oligomenorrea o buscar el embarazo. Difícilmente van a solicitar tratamiento para corregir el hiperinsulinismo y las anomalías metabólicas.

El tratamiento tendrá que ser sintomático y adaptado a las necesidades de la paciente.

Para abordar el tratamiento, hay que considerar que todas las pacientes que sean diagnosticadas de SOP deben presentar oligomenorrea o hiperandrogenismo y que, desde un punto de vista práctico, conviene diferenciar entre las pacientes que buscan la gestación y las que no la pretenden.

ESTUDIO CLÍNICO PREVIO

En el estudio clínico previo es fundamental no confundir las cosas y para ello es estrictamente necesario no llamar ovario poliquístico a cualquier cosa. Cuando menos, hay que aplicar los criterios diagnósticos de Rotterdam aunque, personalmente no me convencen. En otras, palabras, es necesario evitar crear un cajón de sastre en el que, por falta de estudio diagnóstico, cualquier adolescente que cree que las mujeres no tienen pelo acude a la consulta en mayo para ponerse el bañador en julio.

El ovario poliquístico se diagnostica cuando clínicamente existe oligomenorrea o hiperandrogenismo cutáneo (o se documente la hiperandrogenemia) y una imagen característica del ovario en la ecografía. En segundo lugar, es necesario documentar que no existen otras causas de hiperandrogenismo (como un tumor androgenizante o una disfunción suprarrenal, trastornos tiroideos o hiperprolactinemia).

Una vez llegados al diagnóstico de ovario poliquístico, conviene considerar una serie de datos:

Edad, tipo de actividad sexual y motivo de consulta de la paciente

IMC, CA y CA/CC

Grado de hirsutismo

Acné o no

Calvicie o no

Tolerancia a la glucosa y niveles de insulina. HOMA

Perfil lipídico y relación LDLC/HDL

Relación LH/FSH

Independientemente de su deseo de gestar o no, este estudio previo permitirá distinguir distintos tipos de pacientes. Básicamente:

- Pacientes obesas hiperinsulinémicas o no
- Pacientes no obesas hiperinsulinémicas o no

PACIENTES QUE NO BUSCAN LA GESTACIÓN

En esta circunstancia se encuentran pacientes jóvenes o relativamente jóvenes que presentan trastornos del ciclo, hiperandrogenismo cutáneo o ambas cosas y mujeres que, padeciendo un SOP, habiendo gestado vuelven a necesitar tratamiento sintomático.

Aunque es teóricamente posible, rara vez el trastorno es monosintomático y, en general, se asocian oligomenorrea e hiperandrogenismo.

El manejo clínico de estas pacientes incluye medidas de fondo, tratamientos farmacológicos específicos y medidas coadyuvantes.

MEDIDAS DE FONDO

Cualquiera que sea la sintomatología de las pacientes, de forma periódica debe ser valorada la existencia o no de alteraciones del metabolismo de la glucosa o de los lípidos y, a partir de los 25 años, debe controlarse la tensión arterial. En la práctica, esto supone que, anualmente, debe controlarse al menos los índices HOMA y LDLC/HDL.

Si los antecedentes familiares de la paciente lo aconsejan o existe sobrepeso, se instaurará una dieta que, en función del IMC, será de 1.200 a 1.800 Kcal, pobre o no en lípidos.

Independientemente de ello, se insistirá en la necesidad de practicar algún tipo de ejercicio físico.

Estas medidas tenderán a corregir las desviaciones del IMC, mejorarán la acción de la insulina y el metabolismo de glucosa y lípidos. De cualquier forma, se trata de hábitos de vida saludables que, a corto y largo plazo, serán beneficiosos.

El hiperinsulinismo, por sí sólo, es un factor de riesgo cardiovascular. Diagnosticada una paciente de hiperinsulinismo, el clínico debe aconsejar que los parientes en primer grado de la misma comprueben si presentan este trastorno y también si presentan algún tipo de dislipidemia.

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Difícilmente se tratará de una enfermedad monosintomática, es decir de la presencia de oligomenorrea sin hiperandrogenismo cutáneo o viceversa pero esto puede ocurrir en adolescentes.

Los objetivos del tratamiento de las mujeres diagnosticadas de ovario poliquístico que no desean gestar son:

- conseguir un patrón menstrual normal
- corregir el hiperandrogenismo cutáneo
- corregir el hiperinsulinismo, si existe
- corregir el sobrepeso, si existe
- mantener una tolerancia normal a la glucosa y corregir la dislipidemia, si existe

Para alcanzar estos objetivos se cuenta con numerosos recursos farmacológicos, que se describen a continuación.

1. Tratamiento de la oligomenorrea

En dependencia de cómo se defina, la oligomenorrea está presente en, al menos el 40% de pacientes (2). De cualquier manera y por distintas razones, puede ser el síntoma que le preocupa a la paciente y debe ser corregida. También debe serlo si se participa de la opinión de que el déficit de progesterona, a largo plazo, puede ser un factor de riesgo para patologías malignas hormona-dependientes.

Para corregir este síntoma deberá tenerse en cuenta si la paciente es o no sexualmente activa y si su actividad, caso de que exista, se limita a una pareja o se trata de una actividad sexual esporádica.

Si la paciente es sexualmente inactiva, para corregir la oligomenorrea puede bastar con la administración periódica de progesterona o progestágenos. Probablemente, es preferible la progesterona natural, a dosis de 100 mg/día los días 15 a 25 de cada ciclo.

Sin embargo, esta forma de indicación es más difícil de cumplimentar que la toma de un estroprogestativo diario que, si no existe actividad sexual, puede ser secuencial, del tipo del Progyluton®.

Si la paciente es sexualmente activa, puede indicarse un estroprogestativo de carácter anticonceptivo de baja dosis y efecto antiandrogénico, del tipo de Yasmin® o Diane®, que contienen, como gestágeno, drospirenona y acetato de ciproterona, respectivamente.

En el caso de algunas pacientes jóvenes no debe olvidarse recomendar el uso del condón, aunque se esté llevando medicación anticonceptiva.

Bajo la toma de anticonceptivos se deberá controlar periódicamente el HOMA y la relación HDL/LDL colesterol.

La paciente deberá ser advertida de que, al término de la toma de anticonceptivos, puede producirse una amenorrea “post-pill” que siempre podrá ser resuelta con la medicación oportuna.

El tratamiento de los casos asociados a hiperandrogenismo cutáneo se describe más abajo.

2. Tratamiento del hiperandrogenismo cutáneo

El hiperandrogenismo cutáneo puede manifestarse clínicamente como hirsutismo, acné, seborrea y alopecia androgénica. En general, la forma más frecuente es el hirsutismo, que afecta al 60% de las pacientes, aunque pueden asociarse en mayor o menor grado.

El hirsutismo se debe a la producción aumentada de andrógenos que conduce a niveles circulantes aumentados, a la disminución de los niveles circulantes de SHBG, que condiciona un nivel aumentado de andrógenos libres y a la actividad de la 5 α reductasa presente en las células del folículo piloso. Obviamente, los receptores androgénicos también juegan un papel pero la expresión de éstos en las células diana depende de la expresión del gen que codifica su síntesis, que se encuentra en el cromosoma X.

La existencia de un mayor o menor grado de hirsutismo depende también de la ciclicidad del pelo.

De cualquier forma, desde el punto de vista práctico conviene señalar que cualquiera que sea el tratamiento que se decida emprender, los efectos del mismo tardarán en ser patentes y la paciente debe ser advertida, con el fin de que no abandone el tratamiento antes de los 6 meses. Por esta razón, una buena norma es asociar un tratamiento coadyuvante porque, desde el inicio del tratamiento, la salida de pelo será menor y una paciente depilada podrá comprobar antes la efectividad de la terapéutica indicada.

Para el control del tratamiento es conveniente utilizar la escala de Ferriman-Gallwey, aunque las pacientes suelen acudir depiladas a la consulta y esto lo dificulta; una buena alternativa para el manejo clínico es saber cada cuanto tiempo necesitan depilarse.

El tratamiento escogido depende, básicamente, de la intensidad del proceso: se puede optar por bloquear la producción de andrógenos, por aumentar los niveles de SHBG, por controlar el paso de testosterona a dehidrotestosterona, por bloquear el receptor androgénico o por esquemas terapéuticos mixtos.

– Bloqueo de la producción de andrógenos

El bloqueo de la producción de andrógenos implica el bloqueo de la producción de gonadotropinas. Este puede conseguirse con estroprogestativos y con agonistas de GnRH.

Los preparados estroprogestágenos en forma de anticonceptivos orales han sido muy utilizados para

el tratamiento del hiperandrogenismo cutáneo a los largo de décadas. Además de inhibir las gonadotropinas, los estroprogestágenos inducen un incremento de los niveles circulantes de SHBG; de esta forma, el nivel circulante de andrógenos libres disminuye y esto también contribuye a la mejoría del hiperandrogenismo cutáneo. Por último, bajo tratamiento con anticonceptivos hormonales orales se observa una disminución de andrógenos suprarrenales, que se pone de manifiesto por un descenso del nivel circulante de SDHEA (16).

Todos los anticonceptivos ejercen efectos beneficiosos sobre el hiperandrogenismo cutáneo pero es preferible utilizar aquéllos que, junto a una dosis media de estrógenos contienen gestágeno no derivado de la 19 nortestosterona, por el componente de la acción androgénica de ésta.

Son de particular interés los anticonceptivos orales que contienen acetato de ciproterona o drospirenona.

Existe un preparado, Diane® que asocia 35 mg de etinilestradiol a 2 mg de acetato de ciproterona. El tratamiento con este producto resulta beneficioso para el hiperandrogenismo cutáneo ya que, a los efectos descritos para los estroprogestágenos asocia la acción de la ciproterona, consistente en bloquear el receptor androgénico.

Como para otros anticonceptivos el efecto es lento y, en general no se aprecia hasta los 6 u 8 meses, estabilizándose a partir del año.

Puede ser una buena indicación para mujeres jóvenes con un grado moderado de acné o hirsutismo. Su uso no es satisfactorio en hiperandrogenismos severos.

La drospirenona es un derivado de la espirolactona, antagonista de la aldosterona con efectos anti-mineralcorticoides y antiandrogénicos. El preparado Yasmin® está compuesto de 20 mg de etinil estradiol y 3 mg de drospirenona y ha sido utilizado con buenos resultados en cuanto a la mejoría del hirsutismo y el acné.

El bloqueo gonadotropo con un agonista de GnRH tiene como resultado una marcada reducción de los andrógenos de origen ovárico y, en consecuencia, resulta muy efectivo en el tratamiento del hiperandrogenismo cutáneo en el SOP.

Presenta el inconveniente de producir, como efecto secundario, sintomatología climatérica y osteoporosis. En consecuencia, no debe ser utilizado durante más de seis meses. Incluso podría admitirse que acné e hirsutismo no son indicación de tratamiento con agonistas.

Sin embargo, hemos utilizado mucho con esta in-

dicación la asociación de Decapeptyl® a estroprogestativos simples o a los antes referidos, Yasmin® o Diane®. Esta asociación evita la sintomatología climática y la osteoporosis, es perfectamente tolerada y tiene magníficos resultados en el tratamiento del hiperandrogenismo cutáneo. Posiblemente, es el tratamiento con mejores resultados en nuestra experiencia y está especialmente indicado para casos de hiperandrogenismo severo.

– Bloqueo del receptor androgénico

Espironolactona es un antagonista de la aldosterona que compete por el receptor androgénico con la dihidrotestosterona, impidiendo su acción a nivel del folículo pilosebáceo (17); por otra parte, se ha comprobado que, a altas dosis, incrementa los niveles circulantes de SHBG.

Siendo su efecto dosis-dependiente, las dosis deben ser ajustadas en cada caso tanto en función de su efecto como de la tolerancia, ya que las dosis altas producen efectos secundarios (síntomas gastrointestinales, irregularidades menstruales).

En general, no es necesario superar los 100 mg/día y puede asociarse a estroprogestativos. De esta forma, los ciclos son normales y, en mujeres de función renal normal, no se producen efectos secundarios indeseables, a pesar de lo cual conviene controlar la tensión arterial y los electrolitos en los primeros meses de uso.

El acetato de ciproterona es un derivado de la 17-hidroxiprogesterona cuyo mecanismo de acción es complejo: compete con testosterona y dehidrotestosterona a nivel del receptor, disminuye los niveles circulantes de LH, aumenta la eliminación de andrógenos y disminuye la actividad de la 5 α reductasa.

Este compuesto tiene un efecto progestagénico intenso y produce amenorrea por lo que conviene asociarlo a estroprogestativos o utilizar el preparado comercial Diane®. El Diane® asociado a espironolactona demostró ser tan eficaz como la Flutamida en el tratamiento del hirsutismo (18).

Utilizado a dosis de 50 mg/día o mayores es muy efectivo pero puede presentar efectos secundarios más o menos importantes: aumento de peso, disminución de la libido, hepatotoxicidad e incremento del riesgo de tromboembolismo cuando se asocia a etinilestradiol (19).

– Bloqueo de la 5 α reductasa

Finasterida es un inhibidor de la 5 α reductasa tipo II que actúa inhibiendo el paso de testosterona a dehidrotestosterona, y, aunque está especialmente in-

dicado para el tratamiento de la hipertrofia prostática, puede ser eficaz en el tratamiento del hirsutismo, como mostró Falsetti (20). En un estudio randomizado, este mismo autor comprobó que el tratamiento con 5 mg/día de Finasterida es menos eficaz que 250 mg/12h de Flutamida (21); por otra parte, el tratamiento con Finasterida ocasiona un incremento de los niveles circulantes de testosterona (21).

Sin embargo, otro estudio randomizado y ciego realizado por (22) Moghetti y cols no pudo objetivar diferencias en la eficacia de Finasterida, Flutamida y Espironolactona, opinión que no es compartida por otros autores, para quienes Flutamida es más efectiva y mejor tolerada que Finasterida (23).

Flutamida y Finasteride no tienen la indicación para el tratamiento del hirsutismo en nuestro país.

3. Tratamiento del sobrepeso

El tratamiento del exceso de peso, sobrepeso u obesidad no tiene grandes secretos. Es necesario seguir una dieta hipocalórica, pobre en hidratos de carbono de absorción rápida, rica en fibras y, si existe hiperlipidemia, pobre en grasas.

En dependencia del IMC la dieta puede oscilar entre 1.200 y 1.800 Kcal.

A la dieta debe asociarse algún tipo de ejercicio, al menos una hora al día, cuatro días por semana.

La pérdida de peso es un objetivo difícil de alcanzar, sobre todo si existe hiperinsulinismo.

Lo importante es insistir, transmitiendo la idea de que el ovario poliquístico es una situación que no termina con la anovulación o el hirsutismo y que, de no introducir determinados hábitos de vida, puede acarrear riesgos importantes a largo plazo.

4. Tratamiento del hiperinsulinismo

El hiperinsulinismo que acompaña al SOP constituye un importante factor fisiopatológico y, cuando está presente, corregirlo es un objetivo primario.

Evidenciada la presencia de hiperinsulinismo, la primera medida a tomar es indicar una dieta apropiada (ver antes) y la práctica de ejercicio. Estas dos medidas pueden, por sí solas, corregir el hiperinsulinismo puesto que mejoran la acción periférica de la insulina reduciendo la resistencia a la misma (24).

Hace ya 10 años que Nestler y Jakubovicz demostraron la eficacia de la metformina en disminuir el hiperinsulinismo y la actividad del citocromo P450 17 α , enzima que juega un papel clave en la síntesis de andrógenos (24).

Desde entonces, numerosas publicaciones han ido

afianzando la importancia terapéutica de la metformina en el SOP, tanto como única medicación (25) como medicación coadyuvante a clomifeno (26) o gonadotrofinas (27).

Algunos estudios han discutido la efectividad de la metformina (28, 29). Sin embargo, en mi opinión ocurre algo que está presente a lo largo de la casi totalidad de publicaciones sobre el SOP. Se mezclan conceptos en cuanto al diagnóstico, en cuanto a los objetivos de las intervenciones y en cuanto a los parámetros principales.

Es obvio que la metformina corrige el hiperinsulinismo y restaura el ciclo en mujeres SOP hiperinsulinémicas pero no lo es que de ello tenga que derivarse una gestación ni que tenga que ser igualmente efectiva en mujeres no hiperinsulinémicas.

Existen estudios que han evidenciado que el tratamiento con metformina es tan efectivo como el tratamiento mediante "drilling" ovárico per laparoscópico.

En nuestra experiencia y la de otros, el uso de la metformina en el tratamiento del SOP ofrece ventajas adicionales:

- Cuando no existe otra causa de esterilidad permite reproducirse sin excesiva medicalización.
- Contrariamente a lo que ocurre con el clomifeno y las gonadotrofinas, no se observan gestaciones gemelares.

Las mujeres diagnosticadas de SOP que gestan presentan mayor tasa de aborto y mayor riesgo de padecer una diabetes gestacional que las gestantes normales. Ha sido evidenciado que el tratamiento con metformina durante la gestación inicial reduce tanto una complicación como la otra y, por esta razón ha sido recomendado su uso (30) que, lamentablemente, no está autorizado en España.

Recientemente ha sido publicado un magnífico estudio randomizado, doble ciego, por Palumba y cols que ha puesto de manifiesto mayor efectividad de la metformina que del citrato de clomifeno para el tratamiento de la esterilidad por anovulación en el SOP. Parece que puede resolverse así una larga discusión y que, en adelante, habrá que señalar la metformina como la primera opción terapéutica de este trastorno (31).

5. Tratamiento de la dislipidemia

La dislipidemia es un factor de riesgo cardiovascular que debe ser tenido en cuenta en el tratamiento de las mujeres diagnosticadas de SOP que no desean gestar y que presentan este trastorno.

Debe ser corregido el hiperinsulinismo lo que mejorará el trastorno metabólico pero, si persiste la dislipidemia, no debe dudarse en prescribir una dieta pobre en grasas o una estatina.

TRATAMIENTOS COADYUVANTES

No conviene insistir en ellos. Tan sólo comentar que resultan muy útiles debido a la lentitud de acción de los tratamientos farmacológicos.

Puede utilizarse la decoloración del vello o la depilación en cualquiera de sus formas. En todo caso, es importante evitar que el agente utilizado irrite o lesione la piel. El depilado por láser, en buenas manos, suele resultar efectivo e inócuo.

MANEJO DE LA PACIENTE QUE PRETENDE GESTAR

La esterilidad en el SOP está vinculada a la anovulación crónica pero otras causas, que obliguen a considerar el empleo de la inseminación artificial o la fecundación in vitro pueden coexistir.

Ya ha sido comentado el papel de la dieta y el ejercicio y el posible uso de fármacos como metformina y clomifeno.

Respecto al uso de gonadotrofinas, en este tipo de pacientes, pueden ser utilizadas distintas pautas. En nuestra experiencia, se trata de pacientes que:

- Responden a las gonadotrofinas con el reclutamiento de un número aumentado de folículos.
- Presentan un margen escaso entre la dosis eficaz de gonadotrofinas y la que conduce a una respuesta exagerada.
- Presentan un riesgo aumentado de desarrollar un síndrome de hiperestimulación.
- Presentan un riesgo aumentado de embarazo múltiple.

Por estas razones y porque presentan niveles aumentados de LH endógena consideramos preferible utilizar FSH recombinante y hacerlo prudentemente.

a) Inseminación artificial

El objetivo de la estimulación debe ser el desarrollo monofolicular. En consecuencia, consideramos indicada la estimulación del desarrollo folicular con la menor dosis de FSHr que resulte efectiva. Como pauta, creemos preferible la conocida como pauta lenta, empezando con 50 UI/día, salvo que cancelaciones previas por desarrollo multifolicular aconsejen utilizar dosis de 37,5 ó 25 UI/día (32-34).

Se asociará metformina cuando se considere indicado por obesidad o hiperinsulinismo documentado.

b) Fecundación in vitro

Puede utilizarse FSHr asociada a un potente agonista en protocolo largo o a un antagonista. Consideramos

que el antagonista debe utilizarse precozmente, como han propuesto otros autores (35, 36).

En la experiencia de nuestro grupo el empleo de antagonistas ofrece tan buenos resultados como el agonista en protocolo largo, en términos de tasa de gestación, y ofrece, además, la ventaja de menos cancelaciones por riesgo de hiperestimulación ovárica. Una mayor tasa de cancelación es una de las características del tratamiento de mujeres SOP mediante FIV (37).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Goldzieher J, Axelrod L.:** Clinical and biochemical features of polycystic ovarian disease. *Fertil Steril*. 1963; 14: 631-53.
2. **Goldzieher J, Green J.:** The polycystic ovary: clinical and histologic features. *J Clin Endocrinol Metab*. 1962; 22: 325-8.
3. **Jonard S, Dewailly D.:** The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update*. 2004; 10: 107-17.
4. **Webber L, Stubbs S, Stark J, Trew G, Margara R, Hardy K, et al.:** Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*. 2003; 362: 1017-21.
5. **McCartney C, Bellows A, Gingrich M, Hu Y, Evans W, Marshall J, et al.:** Exaggerated 17-hydroxiprogesterone response to intravenous infusions of recombinant human LH in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004.
6. **Gilling-Smith C, Willis D, Beard R, Franks S.:** Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79: 1158-65.
7. **Willis D, Watson H, Mason H, Galea R, Brincat M, Franks S.:** Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 83: 3894-991.
8. **Franks S, Mason H, White D, Willis D.:** Etiology of anovulation in polycystic ovary syndrome. *Steroids*. 1998; 63: 306-7.
9. **Dunaif A.:** Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med*. 1995; 98: 33S-9S.
10. **Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson R, et al.:** Genetics of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 145: 123-8.
11. **Franks S, Gharani N, Waterworth D, Batty S, White D, Williamson R, et al.:** The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1997; 12: 2641-8.
12. **Abbott D, Dumesic D, Franks S.:** Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol*. 2002; 174: 1-5.
13. **Franks S.:** Adult polycystic ovary syndrome begins in childhood. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2002; 16: 263-72.
14. **Chamlian D, Taylor H.:** Endometrial hyperplasia in young women. *Obstet Gynecol*. 1970; 36: 659-65.
15. **Cheung A.:** Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol*. 2001; 98: 325-31.
16. **Wiebe R, Morris C.:** Effect of an oral contraceptive on adrenal and ovarian androgenic steroids. *Obstet Gynecol*. 1984; 63: 12-4.
17. **McMullen G, Van Herle A.:** Hirsutism and the effectiveness of spironolactone in its management. *J Endocrinol Invest*. 1993; 16: 925-32.
18. **Inal M, Yildirim Y, Taner C.:** Comparison of the clinical efficacy of flutamide and spironolactone plus Diane 35 in the treatment of idiopathic hirsutism: a randomized controlled study. *Fertil Steril*. 2005; 84: 1693-7.
19. **Scaman H, De Vries C, Farmer R.:** The risk of venous thromboembolism in women prescribed cyproterone acetate in combination with ethinyl estradiol: a nested cohort analysis and case-control study. *Hum Reprod*. 2003; 18: 522-6.
20. **Falsetti L, De Fusco D, Eleftheriou G, Rosina B.:** Treatment of hirsutism by finasteride and flutamide in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 1997; 11: 251-7.
21. **Falsetti L, Gambera A, Legrenzi L, Iacobello C, Bugari G.:** Comparison of finasteride versus flutamide in the treatment of hirsutism. *Eur J Endocrinol*. 1999; 141: 361-7.
22. **Moggetti P, Tosi F, Tosti A, Negri C, Misciali C, Perrone F, et al.:** Comparison of spironolactone, flutamide, and finasteride efficacy in the treatment of hirsutism: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 89-92.
23. **Muderris I, Bayram F, Guven M.:** A prospective, randomized trial comparing flutamide (250 mg/d) and finasteride (5 mg/d) in the treatment of hirsutism. *Fertil Steril*. 2000; 73: 984-7.
24. **Nestler J, Jakubowicz D.:** Decreases in ovarian cytochrome P450c17a activity and serum free testosterone after reduction in insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 1996; 335: 617-23.
25. **Heard M, Pierce A, Carson S, Buster J.:** Pregnancies following use of metformin for ovulation

- induction in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002; 78: 890-1.
26. **Batukan C, Baysal B.:** Metformin improves ovulation and pregnancy rates in patients with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet*. 2001; 265: 124-7.
 27. **De Leo V, la Marca A, Ditto A, Morgante G, Cianci A.:** Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1999; 72: 282-5.
 28. **Sturrock N, Lannon B, Fay T.:** Metformin does not enhance ovulation induction in clomiphene resistant polycystic ovary syndrome in clinical practice. *Br J Clin Pharmacol*. 2002; 53: 469-73.
 29. **Costello M, Eden J.:** A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003; 79: 1-13.
 30. **Glueck C, Wang P, Kobayashi S, Phillips H, Sieve-Smith L.:** Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002; 77: 520-5.
 31. **Palomba S, Orio F, Falbo A, Mangusto F, Russo T, Cascella T, et al.:** Prospective parallel randomized, double-blind, double-dummy controlled clinical trial comparing clomiphene citrate and metformin as the first line treatment for ovulation induction in nonobese anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90: 4068-74.
 32. **Balasz J, Ballescá J, Pimentel C, Creus M, Fabregues F, Vanrell J.:** Late low-dose pure follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in intrauterine insemination cycles. *Hum Reprod*. 1994; 9: 1863-6.
 33. **Sharma B, Greenwood P, Currie D.:** Inevitable risk of high-order multiple pregnancies following IUI, the need for strict criteria for its prevention: two case reports. *J Obstet Gynaecol*. 2003; 23: 394-6.
 34. **Calaf Alsina J, Ruiz Balda J, Romeu Sarrió A, Caballero Fernandez V, Cano Trigo I, Gomez Parga J, et al.:** Ovulation induction with a starting dose of 50 IU of recombinant follicle stimulating hormone in WHO group II anovulatory women: the IO-50 study, a prospective, observational, multicentre, open trial. *BJOG*. 2003; 110: 1072-7.
 35. **Elkind-Hirsch K, Webster B, Brown C, Vernon M.:** Concurrent ganirelix and follitropin beta therapy is an effective and safe regimen for ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003; 79: 603-7.
 36. **Kolibianakis E, Zikopoulos K, Albano C, Camus M, Tournaye H, Van Steirteghem A, et al.:** Reproductive outcome of polycystic ovarian syndrome patients treated with GnRH antagonists and recombinant FSH for IVF/ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2003; 7: 3132-318.
 37. **Hetinen F, Elikermans M, Hughes E, Laven J, Marklan N, Fauser B.:** A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reprod Update*. 2005; 12: 13-21.