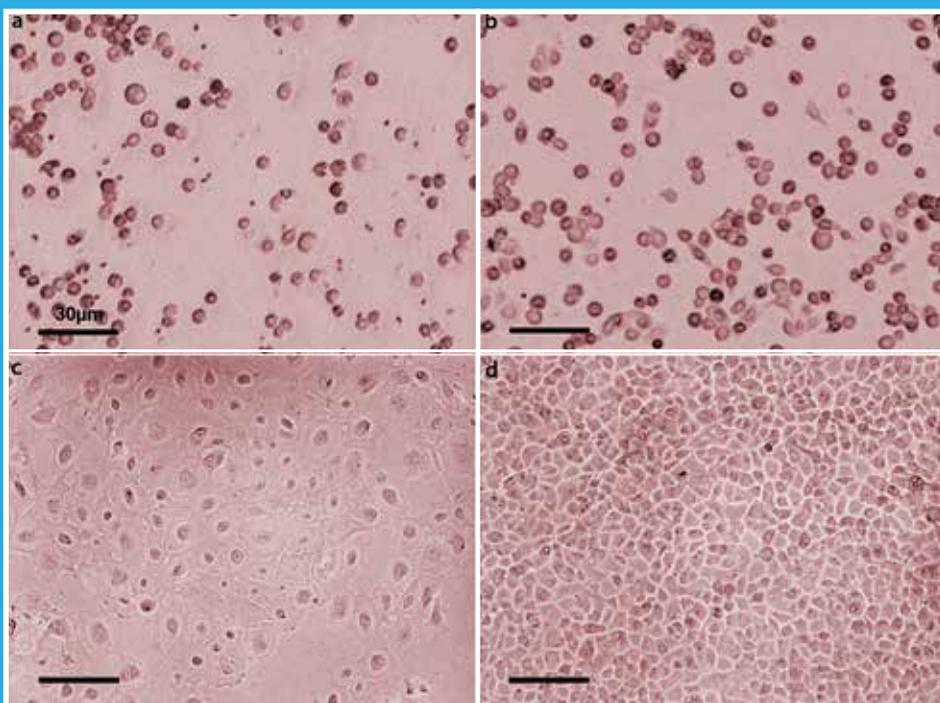


Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva



Contenido de este número:

- El tratamiento *in vivo* con péptido intestinal vasoactivo mejoró los parámetros asociados a las complicaciones gestacionales en un modelo murino
- Endometriosis e infertilidad: una asociación compleja
- Diagnóstico genético del síndrome de Turner
- Células madre amnióticas epiteliales humanas: diferenciación hepática y propiedades regenerativas
- El endometrio humano como sensor de calidad embrionaria

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva



AFILIADA A LA INTERNATIONAL SOCIETY OF GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY (ISGE) Y A LA FEDERACIÓN LATINA DE ENDOCRINOLOGÍA GINECOLÓGICA (FLEG)

Año 25 • Volumen XXV • N° 2 • Diciembre de 2018 • ISSN 1515-8845 (impresa) ISSN 2469-0252 (en línea)

COMISIÓN DIRECTIVA 2018

Presidenta: **Dra. Sandra Demayo**
Vicepresidente: **Dr. Domingo Mugnolo**
Secretaria: **Dra. Adriana Monastero**
Prosecretaria: **Dra. Karina Tozzi**
Tesorera: **Dra. Lara Miechi**

Protesorera: **Dra. Laura Mittelberg**
Vocales Titulares: **Dra. María Belén Pérez Lana, Dra. Constanza Franco, Dra. Roxana Reynoso, Dra. Alicia Jaberbaum**
Vocales Suplentes: **Dra. Lorena Giannoni, Dra. Marina Gelin, Dra. Claudia Vélez, Dra. Karina Sternberg**

COMISIÓN REVISORA DE CUENTAS

Miembros Titulares: **Dra. Érika Abelleira, Dra. Mariana Angeloni, Dra. Valeria Servetti.**

Miembros Suplentes: **Dra. Alejandra Palma Landeau, Dra. María Fernanda González de Chazal, Dra. Vanina Drappa**

COMITÉ EDITORIAL

Directora de Publicaciones: **Dra. Alicia Jaberbaum**, Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires (UBA), Investigadora Principal del CONICET, Directora del Laboratorio de Reproducción y Metabolismo del CEFYBO-CONICET, Facultad de Medicina (UBA), CABA, Argentina.

Subdirectoras: **Dra. Claudia Peyrallo**, Médica Ginecóloga Especialista en Endocrinología Ginecológica y Reproductiva, Integrante de la Sección Reproducción del Servicio de Ginecología del Hospital Rivadavia, Jefa de Endocrinología Ginecológica del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario Fundación Favalaro, Docente (UBA), CABA, Argentina. **Dra. Roxana Reynoso**, Doctora en Bioquímica (UBA), Especialista en Endocrinología ABA-SAEM,

Bioquímica especialista en Endocrinología Ginecológica y Reproductiva (SAEGRE), Docente II Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina (UBA), Investigadora Laboratorio de Endocrinología (UBA), CABA, Argentina.

Colaboradores: **Dra. Laura Estela Boero**, Bioquímica por la Universidad Nacional de Tucumán, Doctora en Bioquímica (UBA), Área Bioquímica Clínica, Especialista en Bioquímica Clínica, Área Endocrinología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), Docente con Formación Pedagógica en Enseñanza Universitaria, Orientación Ciencias de la Salud, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), CABA, Argentina.

Dra. Adriana Monastero, Ginecóloga y Obstetra (UBA), Especialista en Endocrinología Ginecológica y Reproductiva (SAEGRE),

Magíster en Psiconeuroinmunoendocrinología Universidad Favalaro, CABA, Argentina, Fellow del American College of Gynecology and Obstetrics. **Dra. Luciana Poratti**, Médica Ginecóloga y Obstetra, Especialista en Medicina Endocrina y Reproductiva, Médica asociada en el Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Médica de la Sección de Reproducción del Hospital Bernardino Rivadavia, CABA, Argentina. **Dra. Mariela Bilotas**, Doctora en Ciencias Biológicas (UBA), Investigadora Adjunta del CONICET, Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, IBYME-CONICET. **Dra. Rosanna Ramhorst**, Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires (UBA), Investigadora Independiente del CONICET, Laboratorio de Inmunofarmacología IQUIBICEN-CONICET, Profesora Adjunta de la Universidad de Buenos Aires (UBA), CABA, Argentina

Propietaria:

Asociación Civil Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva

Domicilio Legal de la Revista:

Viamonte 2660, piso 6°, of. D (C1056ABR), CABA, Argentina
Registro en la Dirección Nacional de Derecho de Autor:
Exp. N° 5.351.751. ISSN 1515-8845 (impresa)
ISSN 2469-0252 (en línea)

Edita:

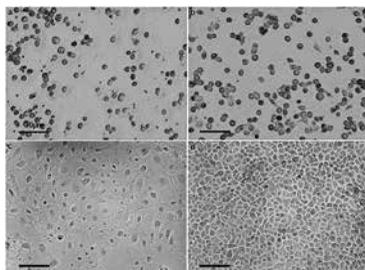
Sello Editorial Lugones® de Editorial Biotecnológica S.R.L.
Socio Gerente: Facundo Lugones
Jefa de Redacción: Lic. María Fernanda Cristoforetti
Coordinación Editorial: Ed. Carolina Bustos
Av. Acoyte 25, 4° piso, of. E (C1405BFA), CABA, Argentina. Tel.: (011) 4903-1090/2210
E-mail: administracion@lugones.com.ar
www.lugoneseditorial.com.ar

Año 25 • Volumen XXV • N° 2 • Diciembre de 2018

Imprenta: Gráfica Offset SRL. Domicilio: Santa Elena 328, CABA, Argentina

La presente edición está impresa en papel libre de cloro.

Tapa



Células madre amnióticas epiteliales humanas durante su diferenciación hepática. Células amnióticas epiteliales (hAEC) fueron incubadas durante (a) 1 día en medio control, (b) 1 día en medio de diferenciación hepática, (c) más de 20 días en medio control y (d) más de 20 días en medio de diferenciación hepática. Se muestran imágenes representativas adquiridas en microscopio invertido de campo claro durante 30 días de diferenciación. (n = 5). Aumento 10X. Escala: 30 µm.

Comité Científico

Presidente

Dr. Gabriel Fiszbajn

Integrantes

Dr. Manuel Nölting
Dr. Sebastián Gogorza
Dra. Susana Kopelman
Dra. Nora Moses
Dra. Alicia Jawerbaum
Dr. Domingo Mugnolo
Dra. María Teresa Nofal
Dra. María Belén Pérez Lana
Dra. Claudia Peyrallo
Dra. Susana Pilnik

Directores de Cursos

Capacitación Superior

Buenos Aires

Dr. Gabriel Fiszbajn
Dra. Laura Mitelberg
Dra. Claudia Peyrallo

Capacitación Superior

Bahía Blanca

Dra. Sandra Antista
Dr. Damián Branca
Dra. María José Iturria
Dra. Karina Tozzi

Capacitación Superior

Córdoba

Dr. Natalio Kuperman
Dra. Viviana Mesch
Dra. Mónica Nãñez
Dra. Lara Miechi

Capacitación Superior

Santiago del Estero

Dr. Manuel Nölting
Dr. Ricardo Aznarez
Dra. Claudia Vélez
Dra. Claudia Trejo
Dra. Alejandra Belardo

Coordinadores de Cursos

De Buenos Aires

Dra. Lorena Giannoni
Dra. Estela Rey

De Bahía Blanca

Dra. María Laura Cesarato
Dra. Marina Gelín
Dra. Karina Sternberg

De Córdoba

Dra. Vanina Drappa
Dra. Valeria Servetti

De Santiago del Estero

Dra. Érika Abelleira
Dra. Mariana Angeloni

Comité de Certificación y Recertificación

Coordinadoras

Dra. Susana Kopelman
Dra. Roxana Reynoso

Miembros

Dr. Manuel Nölting
Dr. Héctor Miechi
Dra. Viviana Mesch

Comunicación Institucional

Dra. Lorena Giannoni
Dra. Valeria Servetti

Delegados Sociedades Internacionales

Dr. Manuel Nölting
Dra. Susana Pilnik

Filiales

Filial Sur

Director: Dr. Fabián Gómez Giglio

Filial NOA

Director: Dr. Néstor Zurqueta

Filial Litoral

Director: Dr. Héctor Miechi

Filial Cuyo. Sede San Juan

Directora: Dra. Graciela Schabelman

Filial Córdoba Centro

Director: Dr. Natalio Kuperman

Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva

Viamonte 2660, piso 6°, of. D (C1056ABR), (C1057AAU), Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Tel.: (5411) 4961-0290. Email: saegre@saegre.org.ar. Sitio web: www.saegre.org.ar

Esta publicación ha sido seleccionada y será indizada para la base de datos LILACS - Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud de publicaciones científicas y la base de datos BINACIS - Bibliografía Nacional en Ciencias de la Salud de Argentina. Estas bases de datos están accesibles desde el sitio de la Biblioteca Virtual en Salud de Argentina en: <http://www.bvs.org.ar> y a nivel regional en el sitio: <http://www.bireme.br>

ÍNDICE

TRABAJO ORIGINAL

- El tratamiento *in vivo* con péptido intestinal vasoactivo mejoró los parámetros asociados a las complicaciones gestacionales en un modelo murino
Lucila Gallino, Guillermina Calo, Daniel Papparini, Daiana Vota, María Soledad Gori, Claudia Pérez Leirós, Rosanna Ramhorst, Vanesa Hauk 41

ACTUALIZACIÓN

- Endometriosis e infertilidad: una asociación compleja
Dr. Edgardo Rolla 47
- Diagnóstico genético del síndrome de Turner
Malena Cavanna, Bárbara De Nardo 59

REVISIÓN

- Células madre amnióticas epiteliales humanas: diferenciación hepática y propiedades regenerativas
Rodrigo Riedel, Cecilia L. Varone, Julieta L. Maymó 70

ANÁLISIS CRÍTICOS POR EXPERTOS DE TRABAJOS SELECCIONADOS

- El endometrio humano como sensor de calidad embrionaria
Comentarios: Dr. A. Gustavo Matínez, Dr. Alberto Valcárcel 77

NOVEDAD BIBLIOGRÁFICA

- Desarrollo independiente del epitelio y del estroma endometrial dentro de la misma endometriosis 79

INDEX

ORIGINAL ARTICLE

- *Vasoactive intestinal peptide treatment improves endpoints associated with gestational failures in murine model*
Lucila Gallino, Guillermina Calo, Daniel Papparini, Daiana Vota, María Soledad Gori, Claudia Pérez Leirós, Rosanna Ramhorst, Vanesa Hauk 41

UPDATE

- *Endometriosis and infertility: a complex association*
Dr. Edgardo Rolla 47
- *Genetic diagnosis of Turner syndrome*
Malena Cavanna, Bárbara De Nardo 59

REVIEW

- *Human amniotic membrane stem cells: hepatic differentiation and regenerative properties*
Rodrigo Riedel, Cecilia L. Varone, Julieta L. Maymó 70

CRITICAL ANALYSIS OF SELECTED ARTICLES: EXPERTS' OPINIONS

- *The human endometrium as a sensor of embryo quality*
Comments: Dr. A. Gustavo Matínez, Dr. Alberto Valcárcel 77

NOVEL ARTICLE

- *Independent development of endometrial epithelium and stroma within the same endometriosis* 79

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

Generalidades

Se podrán enviar artículos para publicar en las siguientes secciones: Trabajo original de Investigación (requiere resultados originales, no publicados previamente en otras Revistas Nacionales e Internacionales); Actualización; Revisión; Casos Clínicos (en estas tres secciones los trabajos se realizarán por invitación del Comité Editorial, deben ser originales, no publicados previamente en Revistas Nacionales e Internacionales y deberán citarse las fuentes de los mismos); y Correo de lectores.

Los manuscritos deben tipearse a doble espacio en papel tamaño A4, en Word for Windows, fuente Times New Roman, tamaño 12, con márgenes de al menos 25 mm y una extensión máxima de 30 páginas.

Los autores deberán enviar original y copia en papel, y una versión electrónica (e-mail, disquete o disco compacto).

Contenido de la Revista

La Revista consta de los siguientes espacios: Trabajo Original de Investigación; Trabajos distinguidos; Actualización; Revisión; Análisis Crítico; Casos Clínicos; Novedades bibliográficas; Sesión científica; Simposio; Cursos; Correo de lectores; Calendario de eventos; Reglamento de publicaciones.

Todos los artículos enviados deberán incluir en la primera página:

Título completo del artículo en castellano y en inglés; nombre y apellido del/los autor/es; título profesional; institución/es afiliada/s; dirección postal y electrónica del autor principal. Se deberá incluir además un título breve, de menos de 50 caracteres. Se debe utilizar el formato que se ejemplifica a continuación:

La endometriosis es un factor de riesgo de hemoperitoneo espontáneo durante el embarazo

Endometriosis is a risk factor for spontaneous hemoperitoneum during pregnancy
Ivo A. Brosens, Luca Fesi, Jan J. Brosens

Leuven Institute for Fertility and Embryology, Leuven, Belgium

E-mail: info@lifeleuven.be

Actualizaciones y Revisiones

Se deberá incluir un resumen de menos de 250 palabras en castellano y en inglés, y hasta 6 palabras clave.

Trabajos originales de investigación

Se deberá configurar el manuscrito de la siguiente forma: resumen en castellano e inglés, que deberá incluir el objetivo, diseño, metodología, los resultados y las conclusiones, de extensión no superior a las 250 palabras. Hasta 6 palabras clave. Secciones: Introducción; Materiales y métodos; Resultados; Discusión; Agradecimientos; Referencias; Tablas; Figuras; Epígrafes.

Casos Clínicos

Los casos clínicos deben ser concisos, informativos y con un límite de hasta 10 páginas a doble espacio, con hasta dos tablas/figuras.

Correo de lectores

Esta sección consiste en un espacio para comentarios de artículos publicados o comunicaciones de interés. Las cartas no deben exceder las 600 palabras, a doble espacio y con un límite de hasta 10 referencias. Incluir dirección completa, teléfono/fax y dirección de correo electrónico. No incluir resumen ni título en inglés. El editor de la REVISTA SAEGRE se reserva el derecho de acortar las cartas que no se ajusten a las especificaciones mencionadas y realizar todo cambio que considere necesario con el objetivo de mantener el estilo de la Revista.

Referencias bibliográficas

Se solicita prestar especial atención para incluir y utilizar el formato apropiado al citar las referencias bibliográficas. Se debe utilizar el estilo Vancouver. El número de referencias máximo por artículo es 50. Numerar las referencias bibliográficas en forma consecutiva, en el orden en que fueron mencionadas por primera vez en el texto y entre paréntesis (Ejemplos: Texto (1), Texto (1-3), que identifica las citas 1 y 3, Texto (1,4), que identifica las citas 1 y 4, Texto (1, 5-7) que identifica las citas 1 y 5 a 7). En cada una de ellas deben figurar todos los autores si el trabajo tuviera hasta 6 autores, o 6 autores, seguido de "et al." si tuviera más de 6 autores. Las referencias bibliográficas que aparecen por primera vez en tablas y figuras deben ser numeradas en el orden que sigue el texto en donde se menciona el texto o la figura. Las observaciones personales no publicadas o comunicaciones personales no podrán ser utilizadas como referencias. Pueden incluirse referencias a textos aceptados

no publicados aún agregando la frase "en prensa". La información de artículos en vías de aceptación puede ser incluida como "observaciones no publicadas".

Se debe utilizar el formato de referencias bibliográficas que se ejemplifica a continuación:

• Artículos de Revistas

1. Takihara H, Sakatoku J, Cockett ATK. The pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril*. 1991;55:861-8.

• Libros

2. Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*, 2nd ed. rev. London: S. Paul; 1986:478.
3. Weinstein L, Swartz MN. *Pathologic properties of invading microorganisms*. En: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*, Vol. 1. Philadelphia: WB Saunders; 1974:457-72.

• Resúmenes publicados en actas de Congresos y Simposios

4. O'Hanley P, Sukri N, Intan N. Morbidity and mortality trends of typhoid fever due to *Salmonella typhi* at the Infectious Disease Hospital (IDH) in North Jakarta from 1984 to 1991 [abstract no. 945]. En: Program and abstracts of the 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1992:268.

• Cartas

5. Kremer J. Yardsticks for successful donor insemination [letter]. *Fertil Steril*. 1991;55:1023-4.

• En Prensa

6. Lillywhite HB, Donald JA. Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science* 2009 (En prensa).

• Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

7. Library of Congress. History and development of the Library of Congress machine-assisted realization of the virtual electronic library [en línea]. [Washington, DC: Library of Congress], 15 June 1993. <gopher://lcmrvel.loc.gov:70/00/about/history> [Consulta: 5 mayo 1997].

Las características de las citas electrónicas son:

Responsable principal. Título [tipo de soporte]. Responsable(s) secundario(s)*. Edición. Lugar de publicación: editor, fecha de publicación, fecha de actualización/revisión. Descripción física*. (Colección)*. Notas*. Disponibilidad y acceso** [Fecha de consulta]**. Número normalizado*.

Los elementos en letra cursiva deben ir en cursiva o subrayados en la referencia; los elementos entre corchetes deben anotarse con esta puntuación; los elementos señalados con un asterisco (*) son opcionales; los elementos señalados con dos asteriscos (**) son obligatorios en el caso de los documentos en línea.

• Abreviaturas y símbolos

Utilizar sólo abreviaturas estándar; en caso contrario, definir las la primera vez que son utilizadas y procurar no incluirlas en exceso.

• Tablas

Deberán tipearse a doble espacio en páginas separadas y deberán ser numeradas en números arábigos en el orden que fueron citadas en el texto por primera vez. Los textos explicativos se incluirán en la forma de notas de pie de página, no en el encabezado. Para las notas de pie de página, utilizar letras minúsculas en forma secuencial (a, b, c, etc.) en superíndice. Las tablas se referirán en el texto entre paréntesis, en letra mayúscula, y en números arábigos consecutivos, ejemplo (TABLA 1).

• Ilustraciones y epígrafes

No se aceptarán gráficos ni fotos en color. Las fotografías se enviarán en blanco y negro, en formato digital y con la mayor resolución posible (mayor de 200 ppp o, de ser posible, mayor de 280 ppp). Las ilustraciones se referirán en el texto entre paréntesis, en letra mayúscula y en números arábigos consecutivos, ejemplo (FIGURA 1). Los epígrafes (aclaraciones de las figuras) deberán tipearse a doble espacio al pie de la figura correspondiente.

• Permisos

Se deberá incluir la leyenda: Conflicto de interés: ninguno o especificar el conflicto de interés existente. Todo material tomado de otras fuentes, incluyendo figuras y/o tablas, debe ser citado y en caso de ser mayor a un resumen (250 palabras), deberá estar acompañado de un consentimiento por escrito que otorgue el permiso a la REVISTA DE SAEGRE para su reproducción.

El tratamiento *in vivo* con péptido intestinal vasoactivo mejoró los parámetros asociados a las complicaciones gestacionales en un modelo murino

Vasoactive intestinal peptide treatment improves endpoints associated with gestational failures in murine model

Lucila Gallino, Guillermina Calo, Daniel Papparini, Daiana Vota, María Soledad Gori, Claudia Pérez Leirós, Rosanna Ramhorst y Vanesa Hauk

Laboratorio de Inmunofarmacología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IQUIBICEN-CONICET, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto de la autora: Lucila Gallino

E-mail: vchauk@qb.fcen.uba.ar

Correspondencia: Int. Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria, Pab. 2, Q559, (1428) CABA, Argentina

Recibido: 31/7/2018

Aceptado: 1/9/2018

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Resumen

Las complicaciones gestacionales que afectan la placentación, como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) y la preeclampsia, representan un problema de salud pública mundial, ya que son condiciones que contribuyen, en gran medida, a la morbilidad materna y neonatal.

Teniendo en cuenta el efecto inmunosupresor y antiinflamatorio del péptido intestinal vasoactivo (VIP), el objetivo del trabajo fue evaluar el papel de este último como tratamiento para mejorar los parámetros gestacionales asociados a ambos trastornos. Para ello, utilizamos como modelo la cruda patológica CBA/J × DBA/2 con alto índice de resorción embrionaria. Al día 6,5 de gestación (posimplantación), realizamos una inyección con VIP intraperitoneal y estudiamos diversos parámetros, como el peso fetal y la expresión de marcadores específicos de placentación. Observamos que el tratamiento con VIP induce en forma autocrina VIP y su receptor VPAC2, y disminuye la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la endoglina soluble (sENG), marcadores asociados a la disfunción placentaria, lo que se refleja en un aumento en el peso de los fetos. Así, a través de la investigación básica, esperamos realizar un aporte al conocimiento de los mecanismos involucrados en la implantación que condicionan la placentación y a la identificación de potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos.

Palabras clave: implantación, mediadores antiinflamatorios, desarrollo placentario y fetal.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV N° 2 Diciembre de 2018: 41-46

Abstract

Gestational complications that affect placentation, such as intrauterine growth restriction (IUGR) and preeclampsia (PE), are a global public health problem since they are conditions that greatly contribute to maternal and neonatal morbidity and mortality. Considering the immunosuppressive and anti-inflammatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP), the aim of this work was to evaluate its role as a treatment to improve gestational parameters associated with pathologies such as PE and IUGR. We used the CBA / J x DBA / 2 matings that normally present a high embryo resorption index as a murine model of the pathological pregnancy. We treated pregnant mice with VIP intraperitoneally at day 6.5 of gestation (postimplantation) and studied different parameters such as fetal weight and the expression of specific markers of placentation. We observed that treatment with VIP induces autocrine VIP expression and its receptor VPAC2; decreases the expression of VEGF and sENG, markers associated with placental dysfunction, and results in an increase of the weights of the fetuses. We expect, through basic research, to contribute to the knowledge of mechanisms involved in implantation that will condition the placentation and identification of potential biomarkers or therapeutic targets.

Key words: implantation, antiinflammatory mediators, placental and fetal development.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV N° 2 Diciembre de 2018: 41-46

INTRODUCCIÓN

Las complicaciones gestacionales asociadas a la insuficiencia placentaria y a defectos en la remodelación vascular, como la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), se asocian a altas tasas de morbilidad materna y neonatal^{1,2}.

No se cuenta, hasta el momento, con ninguna medida terapéutica eficaz para el tratamiento

de la RCIU. En la práctica clínica, se realizan controles más frecuentes del embarazo, estudios biométricos del crecimiento fetal, volumen del líquido amniótico y ecografía Doppler para detectar el aumento de la resistencia en el flujo de las arterias uterinas por la posible indicación de adelantamiento del parto.

En el caso de la preeclampsia, no se dispone de pruebas clínicas que permitan realizar un

diagnóstico precoz. Se informó que diversos biomarcadores que se miden en el plasma materno podrían tener valor predictivo, como el factor de crecimiento placentario (PLGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la endogлина soluble (sENG)³⁻⁵.

Teniendo en cuenta las diferencias con la gestación humana, se han intentado modelar algunos signos de estas complicaciones para comprender los mecanismos etiopatogénicos e identificar posibles biomarcadores o blancos terapéuticos. Entre los modelos en ratón más estudiados, se destaca la cruce CBA/J × DBA/2 como modelo de RCIU y de preeclampsia^{6,7}.

Las evidencias indican que este modelo murino presenta una falla inmunológica asociada al rechazo de la unidad fetoplacentaria, lo que genera una respuesta proinflamatoria exacerbada^{8,9}. En este modelo, las terapias utilizadas hasta el momento están relacionadas con contrarrestar esa respuesta, por ejemplo, mediante la inmunización previa de las hembras CBA/J con esplenocitos provenientes de ratones Balb/c¹⁰, la inyección con GM-CSF¹¹ o el tratamiento con el péptido intestinal vasoactivo (VIP)¹², entre otras.

El VIP es un péptido pleiotrópico producido por neuronas en distintas áreas del sistema nervioso central y el periférico por células endocrinas como los lactotrofos de la hipófisis y el páncreas y por células del sistema inmunitario. Cumple diversas funciones, como ser embriotrófico¹³ o mediar funciones antiinflamatorias e inmunorreguladoras¹⁴. Particularmente en la interfase maternoplacentaria, el VIP es sintetizado por células trofoblásticas humanas^{15,16} y modula su función por mecanismos autocrinos. Más aún, distintas evidencias indican su contribución como inmunomodulador local en la gestación temprana, al producir un microambiente antiinflamatorio favorable para la placentación y el crecimiento fetal en modelos murinos y en seres humanos^{12,17}.

En los estudios previos hemos demostrado que, en los modelos murinos con complicaciones en la gestación, el tratamiento *in vivo* con VIP posimplantación embrionaria restablece los parámetros tempranos asociados a la formación de la interfase maternofetal^{12,18-20}.

Particularmente, evidenciamos que el tratamiento *in vivo* con VIP al día 6,5 de gestación induce un incremento en el número de sitios viables al día 8,5, asociado con un microambien-

te inmunosupresor¹². Por lo tanto, durante el período posterior a la implantación, actúa como un factor inmunorregulador en la generación de la interfase maternoplacentaria y favorece el mantenimiento de la homeostasis tisular.

Dadas las funciones antiinflamatorias y embriotróficas del VIP, nos preguntamos si el tratamiento *in vivo* con ese péptido luego de la implantación embrionaria podría, en la cruce patológica CBA/J × DBA/2, mejorar los parámetros gestacionales asociados a la disfunción placentaria, características de la preeclampsia y de la RCIU.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales utilizados

Se utilizaron ratones machos de la cepa DBA/2 de 10-12 semanas y hembras vírgenes de la cepa CBA/J de 8-10 semanas. Los animales, obtenidos del Bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), fueron mantenidos con ciclos de luz y oscuridad (12:12) y temperatura constantes, en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires hasta la realización de los experimentos. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos estándares establecidos por el Comité de Ética y Cuidado Animal de esa Facultad.

Las hembras CBA/J se colocaron en apareo en una relación 2:1 con los machos DBA/2 y la cópula se constató por observación del tapón mucoso vaginal. A partir de la observación del tapón (considerado día 0,5), se separaron las hembras y se las mantuvo con agua y alimento *ad libitum* hasta el día de preñez indicado.

Tratamiento *in vivo* con VIP

Las hembras CBA/J cruzadas con machos DBA/2 fueron tratadas *in vivo* con VIP (5 nmoles/ratón) o solución fisiológica (SF, vehículo) por inyección intraperitoneal al día 6,5 de preñez, posimplantación embrionaria. Al día 13,5 o 15,5 se las sacrificó por dislocación cervical y se estudiaron las placentas y los embriones (Figura 1).

Peso de los embriones

Los ratones tratados con SF o VIP ($n = 8$ por grupo) se sacrificaron a los días 13,5 o 15,5, y se accedió a los cuernos uterinos a través de una incisión en la cavidad abdominal. Se aisló cada embrión individualmente removiendo la cavidad amniótica y se lo pesó con una balanza analítica.

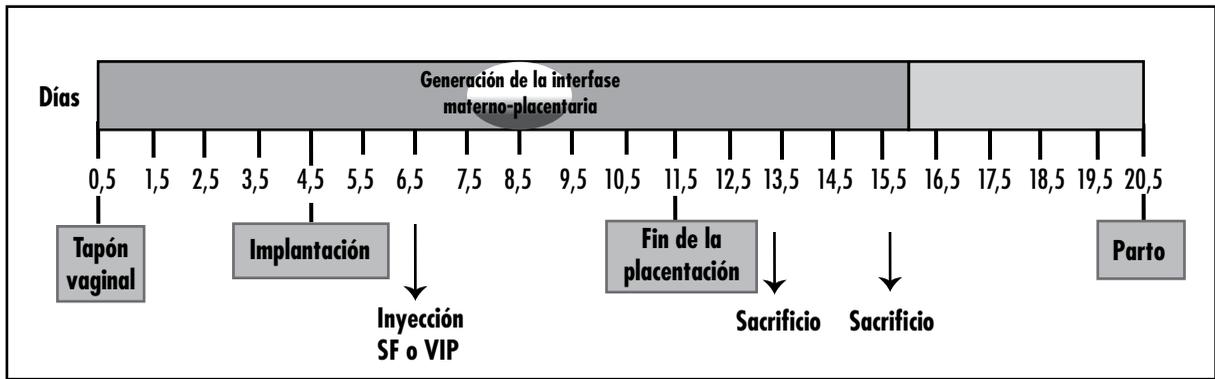


Figura 1: Esquema del diseño experimental en el modelo murino CBA/J x DBA/2.

Extracción de RNA y qPCR

Las placentas asociadas a los embriones pesados se recuperaron y guardaron en Trizol® (Life Technologies) a -20°C hasta su posterior utilización. Para la extracción de RNA total se siguieron las recomendaciones del fabricante. El RNA se cuantificó utilizando el sistema NanoDrop® (ThermoScientific). Para la determinación de la expresión de mensajeros por PCR en tiempo real (qPCR) se utilizó la mezcla FastStart SYBR Green MasterMix (Roche) y los cebadores correspondientes de la Tabla 1 ($0,25\ \mu\text{M}$). Las reacciones se realizaron mediante el sistema de detección MyIQ™2 Real-Time PCR (Bio-Rad). Los datos se analizaron con el programa IQ™5 v2.1 (Bio-Rad) utilizando el método comparativo de Ct y GAPDH o S29 como control interno. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

Análisis estadístico

Se empleó la evaluación estadística aplicando la prueba de la *t* de Student de dos colas para poblaciones independientes. Cuando se requirieron múltiples comparaciones, se utilizó la prueba de ANOVA con contrastes de Newman-Keuls con el *software* GraphPadPrism. Los datos se expresaron como los valores medios \pm error estándar (ES). Se consideraron significativas las diferencias entre las medias cuando $p < 0,05$.

Gen	Secuencia F	Secuencia R
VIP	TTCACCAGCGATTACAGCAG	TCACAGCCATTGCTTTCTG
S29	GGAGTCAACCACGGAAGTCGG	GGAAGCACTGGCGGCACATG
VPAC2	GTGAAGACCGGCTACACCAT	GTGAAGACCGGCTACACCAT
VEGF	GATGTGGGGAAGGAGTTTGG	GATGTGGGGAAGGAGTTTGG
PLGF	GGAGACGACAAAGGCAGAAAG	GGAGACGACAAAGGCA-GAAAG
sENG	GCCCTGACCTGTCTGGTAAAG	GGGTGGAGGCTTGGGATAC

Tabla 1: Secuencias de los cebadores.

RESULTADOS

El tratamiento con VIP induce un incremento en la expresión del sistema VIP/VPAC

Teniendo en cuenta la importancia del sistema VIP/VPAC para la homeostasis durante la gestación, evaluamos si el tratamiento *in vivo* con VIP posimplantación modulaba los niveles de expresión del sistema VIP/VPAC en etapas más tardías de la preñez. Para ello, al día 15,5 de gestación estudiamos en las placentas los niveles de expresión del mensajero de VIP y de su receptor inducible VPAC2 luego del tratamiento con VIP.

Mediante RT-qPCR evidenciamos que el tratamiento con VIP al día 6,5 de gestación indujo un aumento significativo del sistema tanto de VIP como de su receptor VPAC2 en la placenta en comparación con las hembras tratadas con el vehículo (SF) (Figura 2).

El tratamiento con VIP modula los parámetros de disfunción placentaria

Dado que la preeclampsia es un síndrome evidenciado en el tercer trimestre de gestación, pero cuyas causas se remontan al proceso de placentación en etapas mucho más tempranas²¹, nos propusimos investigar cómo el tratamiento *in vivo* con VIP en el período posimplantacional modula la expresión de sENG, VEGF y PLGF asociados a la disfunción placentaria.

Observamos que el tratamiento *in vivo* con VIP disminuyó significativamente los niveles de expresión de sENG y VEGF en las placentas, sin observar diferencias en la expresión de PLGF (Figura 3), lo que parece indicar que el tratamiento temprano con VIP mejora la disfunción placentaria en tiempos más tardíos.

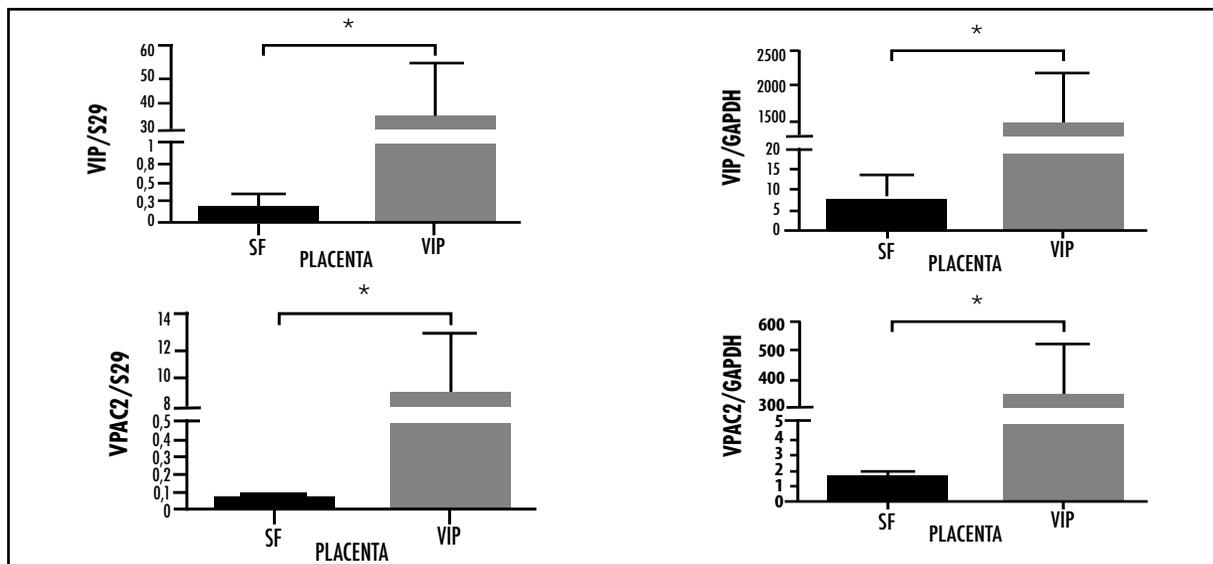


Figura 2: El tratamiento con VIP indujo un incremento en la expresión del sistema VIP/VPAC2. Hembras CBA/J fueron cruzadas con machos DBA/2. Al día 6,5 de gestación fueron inyectadas con vehículo (SF) o con VIP. Al día 15,5 de gestación se aislaron las placenta y se determinó la expresión del VIP y del receptor VPAC2 por RT-qPCR, como se detalla en Materiales y métodos. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct} \times 100$. Como control interno se utilizaron tanto S29 (izquierda) como GAPDH (derecha) (* $p < 0,05$).

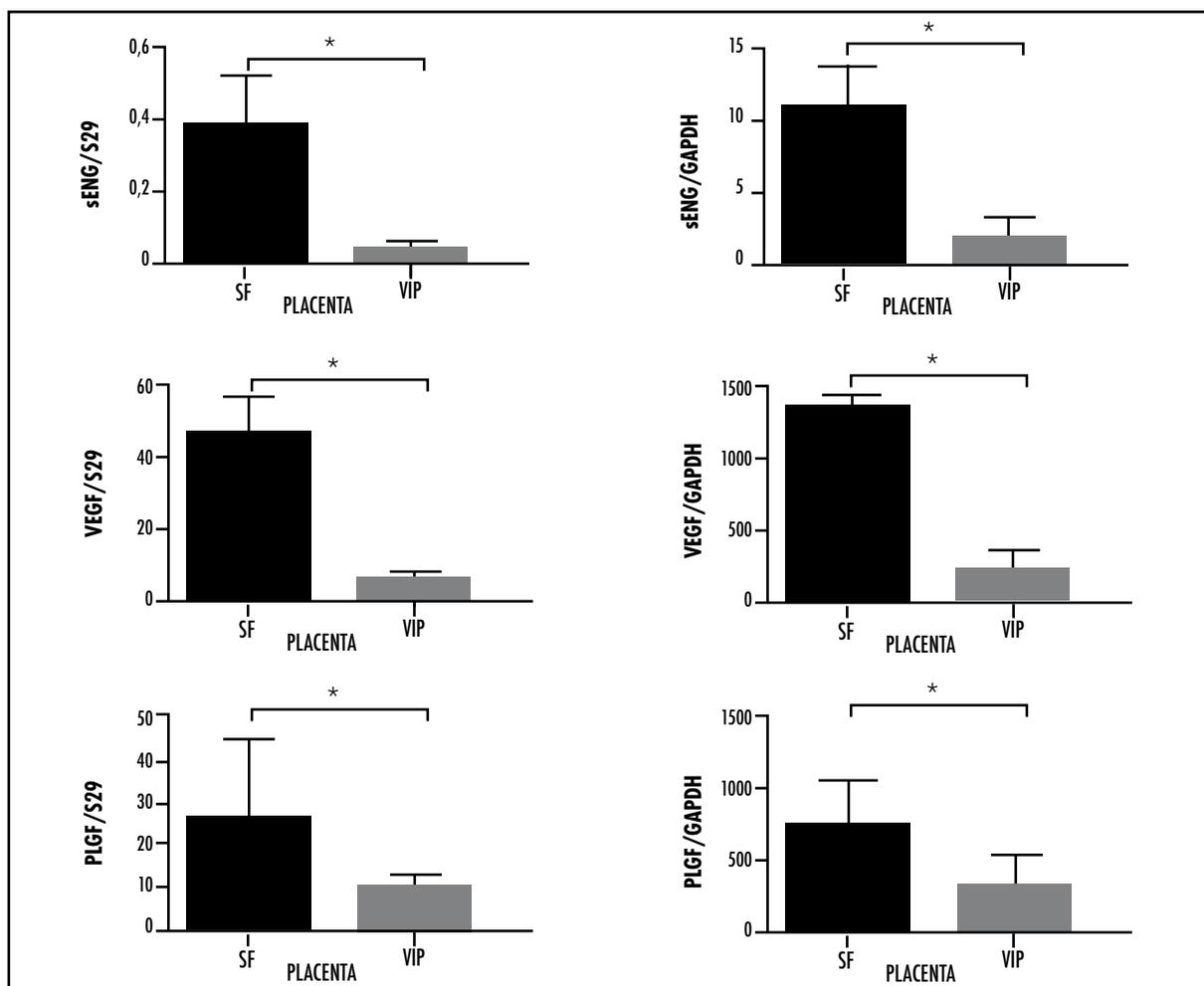


Figura 3: El tratamiento con VIP moduló la expresión de los marcadores asociados a la disfunción placentaria. Hembras CBA/J fueron cruzadas con machos DBA/2 y al día 6,5 de gestación fueron inyectadas con vehículo (SF) o con VIP. Al día 15,5 de gestación se aislaron las placenta y se determinó la expresión de PLGF, VEGF y sENG mediante RT-qPCR. Los resultados se expresaron como $2^{-\Delta Ct} \times 100$. Como control interno se utilizaron tanto S29 (izquierda) como GAPDH (derecha) (* $p < 0,05$).

El tratamiento *in vivo* con VIP induce un aumento en el peso de los embriones

Los estudios previos demostraron que el VIP de origen materno estimula la diferenciación neuronal y contribuye a la ganancia de peso en embriones de ratón estimulados *in vitro* con el péptido^{22,23}. Teniendo en cuenta que el tratamiento *in vivo* con VIP mejora la expresión de los marcadores asociados a la placentación, estudiamos si, además, mejora el peso de los fetos.

Al comparar los embriones de las hembras CBA/J tratadas con VIP o con SF, observamos que tanto al día 13,5 como al día 15,5 hubo un aumento significativo en el peso de los embriones cuando la madre fue inyectada al día 6,5 con VIP (Figura 4).

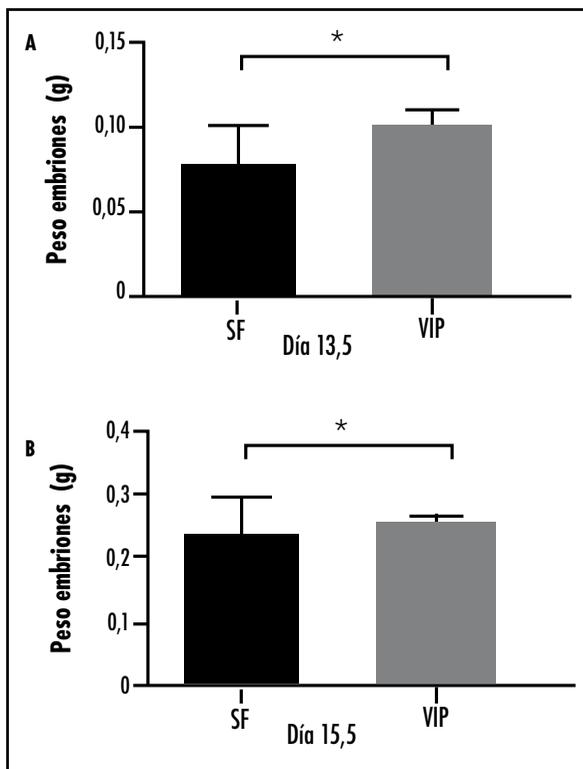


Figura 4: El tratamiento *in vivo* con VIP al día 6,5 de gestación induce un incremento en el peso de los embriones a los días 13,5 y 15,5. Hembras CBA/J al día 6,5 de gestación fueron inyectadas con vehículo (SF) o con VIP y se evaluaron los pesos los días 13,5 (A) y 15,5 (B).

DISCUSIÓN

Las complicaciones gestacionales asociadas a la insuficiencia placentaria, como la preeclampsia o la restricción del crecimiento fetal, se asocian a altas tasas de morbilidad materna y neonatal.

El objetivo de este trabajo fue aportar información sobre el papel del VIP como tratamiento en las complicaciones gestacionales asociadas a la disfunción placentaria en un modelo murino de gestación patológica que presenta características de preeclampsia y RCIU, como es la cruce CBA/J × DBA/2. Para ello, realizamos un tratamiento con VIP en el momento de la posimplantación embrionaria (día 6,5) y evaluamos los parámetros asociados a la placentación y el aumento del peso fetal en etapas más tardías de la gestación, cuando concluyó la placentación (días 13,5 y 15,5).

Los resultados aquí presentados demuestran que el tratamiento *in vivo* con VIP favorece la homeostasis tisular durante la gestación y contribuye al crecimiento fetal. Estas conclusiones están basadas en que el tratamiento *in vivo* con VIP al día 6,5 de gestación indujo un incremento en la expresión del sistema VIP/VPAC2 en las placentas al día 15,5. Por otro lado, disminuyó la expresión de dos marcadores de la placentación, sENG y VEGF, asociados a complicaciones gestacionales, y aumentó el peso fetal.

Las evidencias recientes indican que, en los ratones, la sobreexpresión de VEGF durante la gestación induce defectos vasculares en la placenta. Estas hembras, además, presentan hipertensión, proteinuria y endoteliosis glomerular, síntomas propios de la patología de la preeclampsia²⁴. Por otro lado, en las ratas, la administración de sENG en las hembras preñadas tratadas junto con sFLT1 induce restricción del crecimiento intrauterino²⁵. Así, un aumento en la expresión local de VEGF y sENG en modelos murinos estaría potencialmente asociado al desarrollo de complicaciones gestacionales. La disminución en la expresión de VEGF y sENG en la placenta de las hembras tratadas con VIP podría favorecer el desarrollo de la gestación y evitar los efectos perjudiciales de ambos factores.

Además, el tratamiento con VIP contribuye a la ganancia de peso de los embriones. Estas observaciones son consecuentes con los estudios *in vitro* que demuestran que la estimulación con VIP contribuye a la ganancia de peso en los embriones de ratón²². Estos resultados sugieren que el tratamiento con VIP es eficaz para mejorar los parámetros asociados a la RCIU en este modelo murino.

El hecho de que el tratamiento temprano al día 6,5 pueda mejorar los parámetros estudiados

cercanos al finalizar la preñez, como es el peso fetal, indica que el pulso con VIP activa una cascada de señalización que tiene un efecto duradero de su accionar, ya que estimula su propia producción y la de su receptor VPAC2. Además, el tratamiento con VIP solo requirió una dosis para evidenciar la mejora de diversos aspectos de patologías reproductivas graves.

Así, a través de la investigación básica utilizando modelos murinos con complicaciones gestacionales, esperamos aportar al conocimiento de los mecanismos involucrados en la implantación que condicionarán la placentación y a la identificación de potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Los presentes resultados se obtuvieron dentro del marco del proyecto financiado por la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (2016-0464 a RR y 2016-1937 a VH) y por la Universidad de Buenos Aires (convocatoria 2016).

REFERENCIAS

- Huppertz B, Weiss G, Moser G. Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. *J Reprod Immunol* 2014;101:74-9.
- Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(1):198-206.
- Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia—a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol* 2009;82(2):106-11.
- Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y. Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metabol* 2007;92(7):2672-9.
- Hertig A, Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2010;411(21-22):1591-5.
- Ahmed A, Singh J, Khan Y, Seshan SV, Girardi G. A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PLoS One* 2010;5(10):e13663.
- Girardi G. Guilty as charged: all available evidence implicates complement's role in fetal demise. *Am J Reprod Immunol* 2008;59(3):183-92.
- Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittruecker HW, Levy GA. Cutting edge: cytokine-dependent abortion in CBA × DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase. *J Immunol* 1998;160(2):545-9.
- Duclos AJ, Haddad EK, Baines MG. Presence of activated macrophages in a murine model of early embryo loss. *Am J Reprod Immunol* 1995;33(5):354-66.
- Chaouat G, Kolb JP, Kiger N, Stanislawski M, Wegmann TG. Immunologic consequences of vaccination against abortion in mice. *J Immunol* 1985;134(3):1594-8.
- Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. Control of fetal survival in CBA × DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Infertil* 1990;89(2):447-58.
- Gallino L, Calo G, Hauk V, Fraccaroli L, Grasso E, Ramhorst R, et al. VIP treatment prevents embryo resorption by modulating efferocytosis and activation profile of maternal macrophages in the CBA × DBA resorption prone model. *Sci Rep* 2016;6:18633.
- Gressens P, Hill JM, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE. Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature* 1993;362(6416):155.
- Delgado M, Abad C, Martínez C, Juarranz M, Arranz A, Gomariz R, et al. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med* 2002;80(1):16-24.
- Marziani D, Fiore G, Giordano A, Nabissi M, Florio P, Verdenelli F, Castellucci M. Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005;90(4):2378-83.
- Vota D, Papparini D, Hauk V, Toro A, Merech F, Varone C, Leirós CP. Vasoactive intestinal peptide modulates trophoblast-derived cell line function and interaction with phagocytic cells through autocrine pathways. *Sci Rep* 2016;6:26364.
- Pérez Leirós C, Ramhorst R. Tolerance induction at the early maternal-placental interface through selective cell recruitment and targeting by immune polypeptides. *Am J Reprod Immunol* 2013;69(4):359-68.
- Hauk V, Azzam S, Calo G, Gallino L, Papparini D, Leirós C, et al. Vasoactive intestinal peptide induces an immunosuppressant microenvironment in the maternal-fetal interface of non-obese diabetic mice and improves early pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 2014;71(2):120-30.
- Roca V, Calafat M, Larocca L, Ramhorst R, Farina M, Franchi AM, Leirós CP. Potential immunomodulatory role of VIP in the implantation sites of prediabetic nonobese diabetic mice. *Reproduction* 2009;138(4):733-42.
- Larocca L, Calafat M, Roca V, Franchi AM, Leirós CP. VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages. *Intern Immunopharmacol* 2007;7(10):1343-9.
- Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204(3):193-201.
- Hill JM, McCune SK, Alvero RJ, Glazner GW, Henins KA, Stanziale SF, Brenneman DE. Maternal vasoactive intestinal peptide and the regulation of embryonic growth in the rodent. *J Clin Invest* 1996;97(1):202-8.
- Spong CY, Lee SJ, McCune SK, Gibney G, Abebe DT, Alvero RJ, Hill JM. Maternal regulation of embryonic growth: the role of vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 1999;140(2):917-24.
- Fan X, Rai A, Kambham N, Sung JF, Singh N, Gambhir SS, et al. Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *J Clin Invest* 2014;124(11):4941-52.
- Venkatesha S, Toppersian M, Lam C, Hanai JI, Mammoto T, Stillman IE, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006;12(6):642.

Endometriosis e infertilidad: una asociación compleja

Endometriosis and infertility: a complex association

Dr. Edgardo Rolla

San Isidro Medicina

Contacto del autor: Edgardo Rolla

E-mail: docrolla@gmail.com

Correspondencia: Av. del Libertador 16483, San Isidro (1642), Provincia de Buenos Aires, Argentina

Recibido: 26/2/2018

Aceptado: 26/4/2018

Conflicto de interés: el autor declara no tener conflicto de interés.

Resumen

La endometriosis es una causa frecuente de infertilidad femenina. Afecta la capacidad reproductiva desde lo anatómico, la calidad ovocitaria y la implantación embrionaria. Se asocia a tasas elevadas de aborto espontáneo y complicaciones obstétricas, incluido el hemoperitoneo espontáneo. En esta actualización de la literatura médica reciente, se destacan aspectos vinculados a la depleción de la reserva ovárica, la disrupción de la folículo-génesis y la maduración ovocitaria, la alteración de la esteroidogénesis, la falla de implantación embrionaria, el desbalance de la expresión de micro-RNA y el estrés oxidativo. Se describen los considerandos y las recomendaciones del Consenso mundial para el manejo actual de la endometriosis sobre la cirugía en la infertilidad por endometriosis, la reproducción asistida, los tratamientos médicos y las terapias alternativas. Se citan las guías de las Sociedades de fertilidad, obstetricia y ginecología y se presenta un largo listado de publicaciones recientes. Finalmente, se analiza la cuestión de la adenomiosis y el aumento del riesgo gestacional de estas pacientes. Como cierre de esta actualización, luego de expresar mi opinión personal sobre todos los aspectos analizados, presento una propuesta propia de algoritmo para el estudio y el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis.

Palabras clave: endometriosis, infertilidad, gestación, alto riesgo, endometrioma, fertilización *in vitro*.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV Nº 2 Diciembre de 2018: 47-59

Abstract

Endometriosis is a frequent cause of female infertility. It handicaps her reproductive aptitude alternating pelvic anatomy, oocyte quality and embryo implantation. It is associated to an increase incidence of spontaneous abortion, obstetrical complications, including spontaneous hemoperitoneum. In this update of recent literature, I highlight issues related to the ovarian reserve depletion, follicular development and oocyte maturation, steroid production alteration, the embryo impantation failure, microARNs expression unbalance, and oxidatative stress. I hereby describe considerations and recommendations included in the World Consensus for the Current Management of Endometriosis about surgery for infertility, assisted reproduction, medical treatments and alternative therapies. I present guidelines proposed by Fertility and Ob/Gyn Societies, as well as an extended list of recent publications. Finally, I discuss the issue of adenomyosis and elevated gestational risks. To close the present update, I express my opinion on the subject and present my proposal: an algorithm for the diagnosis and treatment of these patients.

Key words: endometriosis, infertility, gestation, high risk, endometrioma, *in vitro* fertilization.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV Nº 2 Diciembre de 2018: 47-59

INTRODUCCIÓN

Según Brosens, et al^{1,2}, la endometriosis comienza, en las mujeres genéticamente aptas para desarrollar la enfermedad, en el momento del nacimiento. La hemorragia por privación hormonal que presenta el endometrio de la recién nacida –en especial cuando el moco cervical es espeso o el orificio cervical interno es muy estrecho– posibilita el traslado de células del estroma endometrial hacia la cavidad abdominal. En ese momento se producen los primeros implantes.

Si la niña no tiene la aptitud para desarrollar endometriosis, esos focos de tejido endometrial serán reabsorbidos con rapidez por el sistema leucocitario. Por el contrario, si genéticamente

está condicionada para generar endometriosis, los focos, inactivos durante la infancia por la carencia de hormonas sexuales ováricas, quedarán en estado latente y comenzarán a crecer luego de la menarca.

Aun cuando no aceptemos la hipótesis de Brosens, lo cierto es que la endometriosis es una enfermedad que comienza a manifestarse casi sin excepción después de la menarca. Sin embargo, no todos los casos son iguales y los síntomas característicos, algomenorrea, dispareunia, dolor pelviano crónico e infertilidad, se presentan de manera diferente en las distintas portadoras de la enfermedad. Recordemos que la infertilidad es el segundo síntoma más frecuente luego del dolor en sus diversas presentaciones.

El progreso suele ser lento, pero sostenido. El cambio de un paradigma que caracterizó a la raza humana a lo largo de millones de años trajo de la mano la endometriosis como una causa de infertilidad femenina.

En pocos años, quizás a partir de la década de los noventa, las clases medias optaron por retrasar la maternidad. Sea por causas sociales (diferimiento del matrimonio o la convivencia), de estudio o laborales (completar una carrera universitaria o lograr una posición económica estable) o simple hedonismo (privilegiar las amistades en grupo y los viajes dentro y fuera del país), quienes durante siglos se embarazaban al final de la adolescencia ahora lo hacen a la mitad de la cuarta década de la vida.

Cabe, entonces, en este momento hacer un comentario general acerca de cómo y por qué la endometriosis afecta no solo la capacidad reproductiva de la mujer que la padece cuando se busca el embarazo, sino también durante el embarazo. La endometriosis no solo es causa de infertilidad; el devenir obstétrico de las portadoras de la enfermedad que se embarazan es complejo (se deben considerar estos embarazos de “alto riesgo” o, por lo menos, de “riesgo aumentado”, cuestiones que analizaremos más adelante).

En síntesis, podemos decir que esta enfermedad complica la fertilidad de diferentes maneras. Surge de inmediato, al pensar en ella, el daño anatómico que ocasiona: daño ovárico (causado por los endometriomas y agravado por las malas cirugías, en especial cuando son reiteradas), adherencias o daño tubario, bloqueos pelvianos, alteración estructural uterina (adenomiosis), etc.

Pero esto no es todo. Cuando los biólogos en los laboratorios de desarrollo embrionario deben trabajar con ovocitos provenientes de una paciente con endometriosis saben que, a pesar del buen aspecto de estos, las tasas de fertilización serán menores, así como los especialistas en medicina reproductiva saben que las tasas de implantación también lo serán. Más aún, cuando se comparan los ovocitos y los resultados reproductivos de estos entre un ovario “sano” y otro portador de un endometrioma, los resultados contrastan: siempre son peores todos los aspectos reproductivos de los ovocitos del lado afectado. ¿Es la genética alterada la causa de la mala calidad ovocitaria?³

La mala calidad ovocitaria repercute en la calidad embrionaria. El desarrollo de los embriones de las pacientes a quienes se les indicó fertili-

zación *in vitro* (FIV) por endometriosis es más lento e irregular que el de, por ejemplo, las pacientes con obstrucción tubaria. Utilizando el sistema de *time lapse*, en el que se fotografía en forma horaria el desarrollo embrionario antes de la transferencia, Freis et al.⁴ publicaron, en noviembre de 2017, un interesante trabajo en el que se concluyó que los embriones de las pacientes con endometriosis presentan una cinética relativa alterada que sugiere una pobre calidad embrionaria vinculada a la mala calidad ovocitaria.

Antonio Pellicer y Carlos Simón, ya hace muchos años⁵, compararon tasas de implantación y embarazo entre receptoras de ovocitos en programas de ovodonación. Estas siempre fueron menores en las pacientes con endometriosis. Es decir, la implantación está afectada. Este efecto negativo es especialmente notable en presencia de una adenomiosis uterina⁶.

Los focos de endometriosis, sean peritoneales, profundos, ováricos o uterinos, producen una serie de sustancias inmunomoduladoras en cantidades aumentadas respecto de las mujeres sin endometriosis, a la vez que sobreexpresan una serie de genes deletéreos de la fertilidad a lo largo de las distintas etapas del ciclo menstrual.

¿Todo esto es responsable de la mala calidad de los ovocitos y la receptividad endometrial? Se trata de una cuestión en apariencia controvertida: los centros de fertilidad en donde asignan a la cirugía laparoscópica igual estado terapéutico que a la FIV claramente demuestran la conveniencia de la resección de los focos de la enfermedad antes de los procedimientos de reproducción asistida, porque se informan, como lo hizo Thomas D'Hooghe⁷, altas tasas de embarazo espontáneo luego de esta en los estadios mínimo y leve, y resultados de FIV similares a los obtenidos en las pacientes con daño tubario luego de la cirugía. Por el contrario, quienes ignoran la laparoscopia –hecho corriente en nuestro medio– no ven diferencias en las tasas de embarazo entre las pacientes con otras causas de infertilidad y las de endometriosis, concepto que no voy a discutir ni para el cual voy a incluir citas bibliográficas por no ser adecuada la bibliografía al respecto por su baja calidad como evidencia médica.

Hipótesis que vinculan la endometriosis a la infertilidad

Ramalho de Carvalho et al.⁸ publicaron una actualización similar a la presente en la que

sugieren los siguientes mecanismos de acción, más allá de las alteraciones anatómicas antes descritas, que por su fácil identificación no son objeto de discusión:

- Depleción de la reserva ovárica.
- Disrupción de la foliculogénesis y la maduración ovocitaria.
- Alteración de la esteroidogénesis.
- Falla de implantación embrionaria.
- Desbalance de la expresión génica y de micro-RNA.
- Estrés oxidativo.

Sobre la depleción de la reserva ovárica, citan a Lemos et al.⁹, que refieren haber encontrado en Brasil una disminución de esta según las determinaciones de la hormona antimülleriana (AMH). Si bien ellos mismos no pudieron comprobar ese efecto de la endometriosis, hallaron en un grupo de pacientes un aumento general de los valores de FSH en comparación con una población infértil por factor masculino. Según opinan, queda abierta a discusión la controversia acerca del posible daño que, *per se*, puede causar la endometriosis en la función ovárica.

En trabajos de Hock et al.¹⁰ se propuso que habría una disminución progresiva del aparato funcional ovárico según la gravedad de la enfermedad. Por motivos que no se conocen, en los ciclos de FIV las pacientes con endometriosis han demostrado requerir estímulos más prolongados, a la vez que presentan menor desarrollo folicular, así como cambios en la cinética de las células de la granulosa. Estas pacientes generarían ovocitos de mala calidad y, debido a ello, de pobre calidad embrionaria, y fases lúteas insuficientes. Sin embargo, los criterios morfológicos empleados en la actualidad para definir la calidad ovocitaria sugieren niveles de maduración ovocitaria que no se corresponden con la realidad. Se han encontrado mayores proporciones de ovocitos en telofase I entre aquellos que morfológicamente deberían haber estado en metafase II.

La esteroidogénesis alterada, por un efecto negativo sobre la producción de progesterona a partir de las células de la granulosa en la etapa lútea, fue sugerida “como consecuencia de los cambios químicos del líquido peritoneal” en las mujeres con endometriosis, lo que afectaría la capacidad reproductiva de estas mujeres. Abreu et al.¹¹ observaron una disminución de la actividad de la aromatasas y una insuficiente producción ba-

sal de estradiol en los cultivos *in vitro* de células de la granulosa provenientes de pacientes con endometriosis. Este concepto contrasta, de alguna manera, con el que dice que en los focos de endometriosis hay conversión local en estrógenos por un aumento focal de la aromatasas, defendido por muchos autores. La controversia continúa.

Los hipotéticos trastornos funcionales del endometrio, ampliamente enunciados en la literatura médica reciente, deben contribuir, seguramente, a disminuir las tasas de fecundidad de estas mujeres, alterando la facilidad de la implantación embrionaria. La resistencia aumentada a la progesterona –y su correlativa disfunción endometrial– relacionada con las mutaciones génicas de los receptores para progesterona del endometrio (donde se verifica una disminución de ambas isoformas, A y B), que sin duda contribuye al fracaso de la implantación, un círculo que se retroalimenta, la mala respuesta de los receptores a la progesterona y la desregulación epigenética (comprobada en experimentación animal) promueven la elevación de los niveles locales de estrógenos y una sobreexpresión de las metaloproteinasas endometriales. Estos fenómenos facilitan, además, la progresión de la enfermedad. En este punto se destaca la propuesta de Miller et al.¹² acerca de cómo la ingestión de alimentos contaminados por dioxinas alteran en estas mujeres la glucosilación durante la fase secretoria endometrial y comprometen la implantación embrionaria.

Sabemos que no tiene endometriosis quien quiere, sino quien genética y epigenéticamente puede. Se ha verificado hace poco que los micro-RNA pueden presentar una influencia putativa en la génesis de las lesiones endometriósicas, controlando el daño tisular (por hipoxia e inflamación), el crecimiento celular, la proliferación y la muerte celular, la remodelación de la matriz extracelular y la neoangiogénesis indispensable para el crecimiento de estas. La función de los micro-RNA en la regulación génica postranscripcional, que determina que las funciones celulares sean normales o anormales, es diferente en las pacientes infértiles que presentan endometriosis que en aquellas con otros diagnósticos de infertilidad.

El estrés oxidativo se vincula a la endometriosis porque afecta la respuesta inmunitaria en los sitios donde se presenta la enfermedad. Es responsable del estado proinflamatorio del líquido peritoneal y contribuye a la progresión de

la enfermedad. Las altas concentraciones de las especies reactivas al oxígeno (ERO o ROS) presentes posiblemente induzcan la degeneración ovocitaria al causar daño a los procesos meióticos, así como la fragmentación embrionaria. En un estudio prospectivo, Campos Petean et al.¹³ demostraron que las pacientes con endometriosis sometidas a FIV presentaban un aumento de la peroxidación lipídica en el líquido folicular, hecho vinculado a la mala calidad ovocitaria.

Es curioso que, pese a que la infertilidad asociada a la endometriosis es notoriamente un fenómeno social relacionado, en gran medida, con el retraso voluntario de la maternidad en la mayoría de los casos y que este paradigma implica una decisión personal (motivaciones emocionales con repercusión en el aparato psíquico), poco se ha dicho acerca de la personalidad de la paciente con endometriosis y su posible rechazo (inconsciente) a la maternidad.

En el pasado, fui fundador de la *International Infertility Counseling Organization* (IICO) dentro de la *International Federation of Fertility Societies* (IFFS) y del Capítulo de Aspectos Psicosociales de la Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (SAMER) donde se discutieron una y otra vez estos aspectos de la endometriosis sin llegar a ninguna conclusión definitiva. Aprovecho esta actualización para traer a primer plano una cuestión que merecería, sin duda, un mayor protagonismo.

Consenso mundial sobre el manejo actual de la endometriosis

El Consenso, que tuvo su discusión presencial durante el XI Congreso Mundial de Endometriosis (WCE), auspiciado por la *World Endometriosis Society* (WES) en la Ciudad de Montpellier, Francia, en 2011, reunió a 56 participantes que representamos a 34 Sociedades nacionales e internacionales comprometidas con la endometriosis. Fue el primer foro de investigación y discusión sobre esta enfermedad en el que la cuestión de la infertilidad fue el centro principal de atención¹⁴.

Se me asignó la responsabilidad de escribir el Capítulo sobre la utilidad de las técnicas de reproducción asistida en la paciente con endometriosis (*Assisted conception for infertility in women with endometriosis*).

Fuimos instruidos a utilizar en esta revisión solo aquella documentación que tuviera alto grado como evidencia médica, o a destacar el grado

de calidad de esta cuando no reunía esos requisitos. Todo el material aportado por cada uno de los integrantes del Consenso fue evaluado y calificado por todos aquellos que se ofrecieron para hacerlo. Esto les da veracidad y confiabilidad a las observaciones y recomendaciones.

Este Consenso tuvo un objetivo claro: identificar acciones válidas para tratar los distintos aspectos de la enfermedad, sin detenerse en los mecanismos fisiopatológicos de los signos y síntomas vinculados a ella.

Cirugía en el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis

A la cirugía por infertilidad se le asignó un papel preponderante, recomendando seguir los mismos principios identificados para un correcto tratamiento quirúrgico de la enfermedad, destacándose especialmente que se trata de cirugías complejas que solo pueden ser llevadas a cabo por cirujanos laparoscopistas expertos, con amplio conocimiento de la enfermedad. La cirugía convencional por laparotomía no se considera porque no es una herramienta válida ni validada para el correcto tratamiento de la endometriosis.

Es muy importante, según el Consenso, evaluar previamente la reserva ovárica, ya que la cirugía de la endometriosis está vinculada a una disminución de esta. Se ha demostrado que la presencia del endometrioma, más allá del hipotético daño causado por la cirugía, daña el ovario.¹⁵ La densidad folicular estaba significativamente disminuida en la cortical de los ovarios afectados por un endometrioma en comparación con el ovario sano contralateral en la misma paciente. La presencia de fibrosis era destacable en concomitancia con la pérdida del estroma específico de la corteza. En los análisis multivariados se encontró que la presencia del endometrioma se asociaba siempre, y de manera estadísticamente significativa, a fibrosis y disminución de la densidad folicular. En el reciente XIII Congreso Mundial de Endometriosis, en Vancouver, Canadá, en el que participé como único representante argentino, presencié un provocador estudio prospectivo (aún no publicado por lo que no hay datos para la bibliografía) acerca de la progresiva disminución de los valores de la AMH a lo largo de 6 meses en un grupo de mujeres con endometriomas a las que se les pospuso la cirugía. Es el endometrioma, y no la cirugía en manos expertas, la principal causa de la dis-

minución ovárica asociada a esta localización de la enfermedad. Otra cosa es la cirugía desprolija, en manos inexpertas o la cirugía reiterada por el fracaso de una cirugía previa sobre el mismo ovario (persistencia de la enfermedad por cirugía insuficiente, frecuentemente calificada como “recurrencia”).

Sin embargo, en el Consenso se citó a Somigliana et al.¹⁶, quienes en una revisión sistemática encontraron evidencia de que la cirugía del endometrioma se asociaba a una disminución de la AMH en 11 artículos incorporados al metanálisis.

Recientemente, se demostró que los niveles de AMH solo disminuyen temporariamente luego de una correcta cirugía y que los valores de esta hormona a los 12 meses de la quistectomía, sea unilateral o bilateral, se recuperan a los niveles previos.¹⁷

El impacto del dolor en la calidad de vida de la paciente, según el Consenso, debe primar a la hora de tomar la decisión de intervenirla quirúrgicamente; esto es, se debe considerar a la paciente en su totalidad y no solo desde el aspecto reproductivo, algo frecuente en nuestro medio. La cirugía correcta y oportuna aumenta las posibilidades de un embarazo espontáneo o de un embarazo mediante técnicas de reproducción asistida y, además, alivia el dolor.

El Consenso demuestra claramente que en los estadios mínimo y leve de la enfermedad, la cirugía mejora la fertilidad y que si bien no hay evidencia de calidad que demuestre que la escisión de las lesiones sea mejor que la ablación, se recomienda disecar, reseca y extirpar toda la enfermedad posible.

Quienes abogamos por la escisión hemos podido comprobar cómo muchos focos, en apariencia superficiales, suelen infiltrar profundamente el tejido subperitoneal. En esos casos, la destrucción térmica (mala costumbre habitual en nuestro medio) deja enfermedad activa en profundidad.

Ninguna evidencia ha podido demostrar que la cirugía por sí misma mejore la fertilidad en los estadios más avanzados, si bien todos los que operamos habitualmente a estas pacientes hemos visto ocurrir embarazos imposibles después de cirugías radicales. La condición en la que quedan los ovarios y las trompas luego de la cirugía es determinante a la hora de pronosticar el devenir reproductivo de esas pacientes. No hace falta reiterar (pero lo hago) la necesidad imperiosa de que este tipo de cirugías sea reali-

zado exclusivamente por expertos habituados a tratar la endometriosis.

Si bien no está específicamente detallado en el Consenso, a todos los que tratamos en forma integral a la paciente con infertilidad asociada a la endometriosis nos consta que cuando hemos podido reseca toda la enfermedad posible mejoran los resultados de los procedimientos de FIV que les realizamos a estas pacientes.

En el caso de los endometriomas, se recomienda la quistectomía en todos aquellos que superen los 4 cm de diámetro. En otras discusiones, en otros foros, no hay consenso acerca del tamaño que debe indicar una cirugía: 3 cm, 4 cm o 5 cm. Quienes operamos sabemos que cuanto más antiguo sea el quiste, más difícil será su remoción y mayor daño haremos al aparato folicular circundante (el plano de disección se hace más complejo y la fibrosis periquística, más intensa).

En lo personal, considero que 3 cm es un tamaño más que suficiente para proceder a la inmediata cirugía, ya que no solo se tiene en consideración lo evaluado acerca de la calidad ovocitaria, la densidad folicular y la maduración, sino que sabemos por experiencia cómo estos quistes entorpecen y dificultan la punción aspirativa folicular cuando se realizan los procedimientos de FIV. Punzar accidentalmente un endometrioma durante esos actos obliga a descartar esa aguja y continuar la punción con una aguja nueva a fin de no contaminar los ovocitos “limpios”, entre otras cuestiones negativas.

En el Consenso se destaca el cuidado que se debe tener al realizar la hemostasia del lecho de quistectomía luego de esta. Electrocoagular en exceso, sin duda, va a provocar fibrosis y daño térmico en el hilio ovárico y, de esa manera, posiblemente afectar la reserva ovárica. En muchos casos es mejor la sutura a fin de preservar el ovario.

A contramano de lo antedicho, se recomienda analizar con la paciente joven la conveniencia de criopreservar ovocitos antes de la cirugía, si bien es importante destacar que solo se trata de una opinión no documentada del responsable del Capítulo.

Por mi parte, sugiero la cirugía cuidadosa previa y valorar la conveniencia y la necesidad de la criopreservación ovocitaria luego de aquella debido a la mejor calidad de ovocitos disponibles en esa instancia, por la baja de todas las sustancias presentes en la endometriosis no tratada.

Con respecto a la endometriosis profunda infiltrante (nódulos en el tabique rectovaginal, compromiso ureteral, infiltración vesical, etc.), el Consenso concluye que no hay evidencia de la conveniencia de operar a estas pacientes a fin de mejorar la fertilidad, si bien algunos estudios observacionales (de restringido valor como evidencia médica) sugieren una mejoría de la capacidad reproductiva luego de una cirugía correcta. Todas las técnicas (*shaving*, resección discal o segmentaria) parecerían tener igual resultado desde la óptica de la fertilidad, pero no hay estudios prospectivos que así lo aseguren.

En el Consenso se deja bien especificado que este tipo de cirugías debe considerarse una segunda línea de tratamiento luego del fracaso de una FIV, cuando esta no sea posible o cuando la sintomatología dolorosa sea muy severa.

En lo personal adapto mi criterio a cada caso en particular. Algunas pacientes mejoran, haciendo más sencilla la cirugía, luego del embarazo y la lactancia, pero también se describió el sangrado o la peritonitis como complicaciones (poco frecuentes, pero existentes) durante la gestación en pacientes con enfermedad rectovaginal no tratada. Las lesiones a más de 8 cm del margen anal, que pueden resecarse por vía laparoscópica sin necesidad de una colostomía transitoria, deberían (en mi opinión) operarse una vez diagnosticadas, pero aquellas que seguramente van a requerir la colostomía por estar muy cercanas al esfínter anal, podrían diferirse.

Cabe en este sentido destacar que las cirugías sobre el colon, cuando sea necesaria la resección discal o segmentaria, deben ser realizadas exclusivamente por equipos multidisciplinarios, con la participación de cirujanos generales expertos en resección segmentaria y anastomosis laparoscópica.

El Consenso establece que la tasa de embarazo luego de la cirugía reiterada (en todos los estadios y localizaciones de la enfermedad) es menor, aproximadamente la mitad, que luego de una primera cirugía. Un segundo ciclo de FIV (tras el fracaso del primero) podría ser más efectivo. Sin embargo, la cirugía debe considerarse en aquellas mujeres en las que el dolor predomine, cuando son portadoras de un endometrioma que aumenta de tamaño o ante el fracaso reiterado de la FIV.

Si la búsqueda del embarazo es el motivo de consulta, no hay lugar para el tratamiento médico hormonal en el posoperatorio. En el mejor de los casos, además de no haber de-

mostrado utilidad para aumentar las tasas de embarazo, solo difiere el logro del embarazo, porque todos esos tratamientos tienen un efecto anovulatorio. Evitan la posibilidad del embarazo espontáneo en el posoperatorio inmediato, que es el momento en el que ocurren con mayor frecuencia. Veremos más adelante que solo en algunas presentaciones severas, la supresión de la función ovárica antes de una FIV, por poco tiempo, podría ser de beneficio.

Fertilización asistida en el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis

Fui designado por el Consenso para escribir el Capítulo sobre la utilidad de los distintos procedimientos de fertilización asistida en el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis.

La inseminación artificial intrauterina (IIU) en ciclos de estimulación ovárica es una opción efectiva para el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis en los estadios I y II, siempre y cuando haya normalidad tubaria. En mi presentación al Consenso, dejé en claro que debe hacerse bajo estímulo ovárico, preferentemente utilizando gonadotropinas, ya que los resultados son mejores que con el citrato de clomifeno. Los resultados de la IIU en ciclos espontáneos son inciertos cuando el procedimiento se indicó por una endometriosis. Deben tomarse los recaudos para disminuir la posibilidad de un embarazo múltiple, recurriendo a los criterios por todos conocidos a la hora de proseguir o cancelar un ciclo de IIU según el número de folículos desarrollados. No hay datos acerca de la posible mejoría de las tasas de embarazo utilizando doble IIU en días sucesivos.

La FIV debe ofrecerse como primera alternativa en los estadios más severos o cuando existe daño tubario, así como dentro del contexto de una edad materna avanzada o un factor masculino que la indique.

No hay evidencia clara de que la estimulación ovárica sola, sin el complemento de la IIU, sea efectiva en el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis, aun empleando gonadotropinas en lugar de, por ejemplo, el letrozole.

Siempre debemos tener presente el hecho de que la paciente con endometriosis tendrá una tasa de embarazo por FIV menor que en otras causas de infertilidad. Sin embargo, este procedimiento se recomienda, en especial, cuando hay

daño tubario. Al respecto, y desde mi experiencia personal, debe considerarse que por el solo hecho de que los ovarios se encuentren adheridos al peritoneo en la fosa ovárica por la endometriosis, aun cuando las trompas sean permeables y en apariencia normales, las tasas de embarazo espontáneo o mediante la IIU son bajas, ya que se encuentra alterada la anatomía funcional del aparato anexial, incluso luego de la ooforolisis y un resultado quirúrgico óptimo en lo visual.

Desde los aspectos técnicos, el empleo de agonistas o antagonistas de GnRH derivan en tasas de embarazo similares, reiterando el concepto de que serán más bajas que para otras indicaciones de la FIV.

Una preocupación frecuente de quienes asisten a estas pacientes es el temor de que esos tratamientos aumenten la posibilidad de la recurrencia de la enfermedad. Según D'Hooghe et al.¹⁸, los procedimientos de FIV no incrementan la recurrencia de la endometriosis.

Terapias adyuvantes a la fertilización asistida

Los tratamientos médicos, como se dijo, incluido el uso de agonistas de GnRH antes de la IIU bajo estímulo ovárico, no se recomiendan por la falta de evidencia que demuestre su utilidad. Sin embargo, los tratamientos previos de supresión ovárica con agonistas de GnRH mejorarían las posibilidades de éxito de la FIV. No hay evidencia de que el uso de anticonceptivos orales pueda ser de beneficio.

Si se considera que las endometriosis severas, con múltiples focos peritoneales, adherencias, nódulos rectales, endometriomas, etc., se comportan como verdaderas peritonitis crónicas asépticas y que la supresión ovárica empleando agonistas de GnRH por períodos breves (3 a 4 meses), al frenar la actividad de los focos de la enfermedad, reduce los componentes inmunohistoquímicos (factores de crecimiento, interleucinas, células NK o *natural killer*, etc.) presentes en la cavidad abdominal, mejora la calidad ovocitaria y posiblemente también la receptividad endometrial, desde mi criterio personal es un recurso útil antes de la FIV. En el capítulo precedente sobre IIU y FIV así lo presenté y documenté en el Consenso.

El beneficio real de la quistectomía del endometrioma antes de una FIV –en cuanto a la tasa de embarazo– no es claro, si bien puede mejorar el acceso a los ovarios y hasta disminuir la posibi-

lidad de una infección en el momento de la punción aspirativa folicular. Al respecto, recordemos que el Consenso recomienda operar todos aquellos endometriomas mayores de 4 cm de diámetro.

Si bien la cirugía luego del fracaso reiterado de la FIV puede, en algunos casos, mejorar las posibilidades de lograr un embarazo naturalmente, su papel como adyuvante de la FIV es discutible.

Tratamiento médico (exclusivo) de la infertilidad asociada a la endometriosis

Citando a Hughes et al.¹⁹, no hay evidencia de que la supresión de la ovulación pueda mejorar las posibilidades de lograr el embarazo (espontáneamente o mediante reproducción asistida) y en todos los casos va a retrasar la concepción (que no será posible mientras duren sus efectos), por lo que no se recomienda.

Tratamientos “emergentes” (terapias alternativas) de la infertilidad asociada a la endometriosis

Un reciente trabajo prospectivo y aleatorizado de Reilly et al.²⁰ demostró que realizar una hidro-tubación utilizando lipiodol *vs.* un medio acuoso de contraste no mejora las posibilidades de una FIV, en contraposición con una publicación previa de Johnson y Farquhar²¹, en la que se verificó un aumento de las tasas de embarazo espontáneo luego de realizar histerosalpingografías empleando ese medio de contraste.

Creo que los riesgos de embolia oleosa por los que se ha abandonado en nuestro país el empleo del lipiodol para la realización de las histerosalpingografías exceden el posible beneficio de esta alternativa, por lo que no deberíamos considerarla en absoluto.

Otros tratamientos que emplean pentoxifilina, medicina china tradicional, vitamina C, vitamina E, mifepristona, rosiglitazona o ácido valproico no han demostrado utilidad alguna.

Qué dicen las sociedades de fertilidad y ginecología/obstetricia acerca de la endometriosis y la infertilidad

La *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) desde su Comité de Práctica produjo, en 2012, un documento denominado “Fertilidad y endometriosis: una opinión del Comité”²², según el cual (y citando a diferentes autores) un 25-50% de las mujeres infértiles presentan endometriosis, así como 30-50% de las que la padecen son infértiles.

Citan la literatura especializada en general, donde se menciona que en los casos en los que se realiza una laparoscopia para contracepción quirúrgica voluntaria (ligadura tubaria bilateral), se encuentra la presencia de endometriosis en menos del 7% de las pacientes, mientras que cuando la indicación se realiza como estudio complementario por infertilidad, las cifras son de 9-50%.

En los casos de dolor pelviano crónico, la incidencia de la endometriosis es de 30-80%. Recordemos que muchas de estas mujeres, además, en algún momento de su vida van a consultar por infertilidad.

Según el Comité, si bien hay una cantidad importante de evidencia acerca del vínculo entre la endometriosis y la infertilidad, la causalidad de esta por la enfermedad aún es controvertida porque no se ha podido establecer debidamente el mecanismo por el cual esto ocurre.

El documento enumera las posibles causas de infertilidad y comienza destacando las alteraciones anatómicas que pueden dificultar la captación del óvulo por parte de las trompas de Falopio.

Hace referencia a las alteraciones de las funciones peritoneales: aumento del volumen del líquido peritoneal y de las concentraciones en este de prostaglandinas, proteasas, citoquinas inflamatorias, como la IL-1, la IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa y citoquinas angiogénicas, como la IL-8 y el factor de crecimiento del endotelio vascular producido por los macrófagos. Todo ello podría tener efectos nocivos sobre los ovocitos, el semen que llega a las trompas, las trompas de Falopio (en especial en la función fimbrial) y hasta en los embriones formados luego de la fertilización en la ampolla tubaria.

Los anticuerpos de clase IgA e IgG y los linfocitos pueden tener un papel deletéreo sobre el endometrio y la implantación embrionaria en estas pacientes, ya que se los encuentra en niveles elevados, así como los autoanticuerpos contra los antígenos endometriales.

Los trastornos endocrinos, como el síndrome de luteinización folicular anovulatoria, fase folicular inadecuada, desarrollo folicular anormal o presencia de múltiples picos de hormona luteinizante (LH) durante la fase folicular, son frecuentes en las mujeres con endometriosis, pero no se ha podido relacionar estas anomalías con la falla reproductiva.

Se ha sugerido que algunas alteraciones de la función endometrial, como la subexpresión de la integrina avb3 (una molécula que interviene en

la adhesión celular) y la secreción disminuida de la selectina L, podrían ser responsables de la falla de implantación embrionaria.

Para el Comité, es posible que las concentraciones anormales de citoquinas y progesterona en el líquido folicular verificadas en las pacientes con endometriosis sean responsables, en parte, de la mala calidad ovocitaria. Citan a Pellicer, quien ya en 1995 había informado que los embriones formados a partir de estos ovocitos se desarrollaban más lentamente que aquellos de las mujeres que hacían tratamientos de FIV por obstrucción tubaria.

Esta publicación hace referencia al trabajo de Simón de 2002²³, en el que se observaron menores tasas de embarazo transfiriendo ovocitos donados por pacientes con endometriosis a receptoras sin la enfermedad, mientras que cuando se transferían ovocitos donados por pacientes sin endometriosis a quienes eran portadoras, las tasas de embarazo eran similares a las de las mujeres con otras patologías. Si esto fuera así, correspondería descartar el componente endometrial como causal de la falla de implantación.

En el documento se mencionan los trastornos de la motilidad y el transporte tubario, cuando se compara mediante salpingoescentografía con pacientes infértiles por factor masculino. Si bien parece una propuesta que añadiría otra consecuencia negativa para la fertilidad, según el Comité la evidencia actual no es suficiente y se requieren estudios ulteriores a fin de determinar si esto es así.

Luego de una serie de sugerencias y recomendaciones acerca de los tratamientos posibles contra la infertilidad asociada a la endometriosis (que no difiere de lo ya mencionado en esta publicación), el documento concluye con algunos planteos que conviene destacar:

- La decisión clínica es difícil porque no hay suficientes trabajos prospectivos y aleatorizados ni evidencia de alta calidad que hayan investigado muchos de los puntos en cuestión referidos a la infertilidad por endometriosis.

- Los datos de los trabajos observacionales son conflictivos e impiden llegar a conclusiones firmes.

- En los casos en los que se sospecha la presencia de endometriosis mínima o leve, la cuestión pasa por indicar o no una laparoscopia antes de realizar tratamientos como la inducción de la ovulación (con citrato de clomifeno o gonadotropinas) o técnicas de reproducción asistida como la FIV. La edad de la paciente, el tiempo de infertilidad, los

antecedentes familiares y el dolor pelviano deben considerarse al evaluar la conducta por seguir.

- Podría no tener indicación la laparoscopia en las pacientes “asintomáticas” (sin dolor) ya que, de estar presente, la enfermedad correspondería a estadios iniciales (en los que se podrían indicar los tratamientos de asistencia reproductiva sin otro requisito).

- Llegado el caso de la laparoscopia, y basado en evidencia de alta calidad, se debe proceder a la remoción o destrucción de toda la enfermedad presente.

- En las mujeres más jóvenes se podría tener una conducta expectante luego de la cirugía.

- Se puede, también, indicar una IIU, si bien el número de procedimientos necesarios para lograr un embarazo adicional es de 14.

- En pacientes mayores, se puede indicar un procedimiento de reproducción asistida en el posoperatorio inmediato, advirtiéndoles que, en todos los casos, los resultados serán inferiores a los que se logran mediante estos tratamientos por otras causales de infertilidad.

- La evidencia recomienda la cirugía en los casos más avanzados de la enfermedad, pues mejora la fertilidad espontánea o asistida.

- Los endometriomas mayores de 4 cm de diámetro deben operarse, ya que de esa manera es posible confirmar el diagnóstico histológico, facilitar la punción aspirativa folicular y, posiblemente, mejorar la calidad ovocitaria.

- En los casos más severos, la cirugía reiterada no mejora la fertilidad sustancialmente y, por ello, es adecuado indicar nuevos procedimientos de FIV antes de repetir la cirugía.

Finalizando el documento, el Comité realiza las siguientes consideraciones y recomendaciones:

Hay insuficiente evidencia como para afirmar que la quistectomía del endometrioma antes de la FIV pueda mejorar los resultados.

Los resultados de la FIV en estas pacientes son menores que en otras indicaciones. No obstante, estos procedimientos aumentan significativamente la fecundidad por ciclo respecto de la conducta expectante.

Las pacientes con endometriosis que se embarazan tienen mayor incidencia de partos prematuros, preeclampsia, hemorragia gestacional y necesidad de cesárea.

Como conclusiones, el documento dice que:

Se deben considerar la edad de la mujer, la

presencia de dolor, el tiempo de infertilidad y el estadio de la enfermedad al proponer un plan de tratamiento.

La evidencia actual no permite recomendar la laparoscopia como tratamiento en los casos mínimos y leves para aumentar la fertilidad.

Cuando la laparoscopia se realice por otras indicaciones, el cirujano debe considerar el tratamiento quirúrgico de las lesiones endometriósicas que encuentre.

En las mujeres menores de 35 años portadoras de los estadios I y II de la enfermedad, la conducta expectante o los procedimientos de estimulación ovárica o IIU pueden considerarse la primera línea terapéutica.

En las pacientes con estadios moderados y severos, la cirugía laparoscópica o laparotómica puede ser de beneficio para mejorar la fertilidad.

El tratamiento ideal del endometrioma es la quistectomía *vs.* el drenaje y la coagulación.

En los casos de enfermedad moderada o severa, en especial en las mujeres de mayor edad, la FIV debe considerarse una buena alternativa. En los cuadros siguientes se resume la opinión de la *European Society for Human Reproduction and Embriology*²⁴ (Tabla 1), el *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (GB)*²⁵ (Tabla 2) y la *Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada*²⁶ (Tabla 3).

Estas recomendaciones coinciden en algunos puntos y difieren en otros. Rescato la propuesta de suprimir la función ovárica (con análogos de GnRH) durante un tiempo breve, 3 meses, pero disiento con la sugerencia de este tipo de tratamientos durante 6 meses. En el último de los casos, como ya mencioné, se deben considerar otros factores, como el de la edad de la paciente, el tiempo de duración de la infertilidad o los factores asociados.

<ul style="list-style-type: none"> • En las formas mínimas y leves la supresión ovárica no es efectiva a los fines de mejorar la fertilidad
<ul style="list-style-type: none"> • La resección de las lesiones endometriósicas y adhesiolisis es superior a la laparoscopia exclusivamente diagnóstica en estos estadios
<ul style="list-style-type: none"> • No hay evidencia suficiente como para determinar si la resección quirúrgica de las lesiones mejora las posibilidades de embarazo en los casos moderados y severos
<ul style="list-style-type: none"> • La FIV es un tratamiento indicado, en especial cuando coexisten otras causas de infertilidad o ante el fracaso de otros tratamientos
<ul style="list-style-type: none"> • Las tasas de embarazo por FIV de las portadoras de endometriosis son menores que las de las pacientes que presentan obstrucción tubaria

Tabla 1: Tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis según la *European Society for Human Reproduction and Embriology*²⁴.

• La supresión de la función ovárica en la endometriosis mínima y leve no es efectiva y no debe indicarse
• No hay evidencia de su utilidad en casos más severos
• La ablación de las lesiones y adhesiolisis es útil para mejorar la fertilidad en los casos mínimos y leves
• En las moderadas y severas el papel de la cirugía es incierto
• La quistectomía del endometrioma es mejor que el drenaje y la coagulación del lecho del quiste
• El tratamiento hormonal posquirúrgico no aumenta las tasas de embarazo
• El lavado tubario mejora las tasas de fertilidad en los casos de infertilidad asociada a la endometriosis
• La inseminación intrauterina mejora la fertilidad en los estadios mínimos y leves
• La FIV es un tratamiento apropiado, en especial cuando hay compromiso tubario o factores asociados
• La quistectomía laparoscópica se recomienda cuando el tamaño es mayor de 4 cm
• La supresión ovárica por 3 a 6 meses luego de la cirugía mejora los resultados de la FIV
• Las asociaciones de ayuda de pacientes son útiles para asesoramiento, apoyo e información

Tabla 2: Tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis según el *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (GB)*²⁵.

• La cirugía laparoscópica mejora las tasas de fertilidad en los casos mínimos y leves
• En la endometriosis profunda infiltrante el efecto de la cirugía es controvertido
• La extirpación de endometriomas mayores de 3 cm puede mejorar la fertilidad
• Los tratamientos hormonales no mejoran la fertilidad y no deben ofrecerse
• Excepción hecha de la supresión ovárica por 3 a 6 meses antes de la FIV

Tabla 3: Tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis según la *Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada*²⁶.

Qué dice la literatura médica reciente sobre la infertilidad asociada a la endometriosis

Una rápida búsqueda en *Scholar Google* produce una sorpresa: seleccionando solo artículos publicados en 2017 (a los que se suman algunos de 2018), se obtienen 5470 citas. Es lógico comprender que es imposible leer detenidamente todo ese material. Trataré de identificar aquellos trabajos correspondientes a nuevas ideas, nuevas propuestas, nuevas tecnologías como una forma de destacar brevemente esos aspectos.

- Se da importancia a la población uterina de células progenitoras de las NKC como predictor de la tasa de implantación en las mujeres con endometriosis.

- Los resultados de la FIV mejoran, según dos centros expertos, realizando la cirugía colorrec-

tal en las pacientes con infertilidad asociada a la endometriosis cuando hay lesiones profundas infiltrantes a ese nivel.

- Relacionan las expresiones alteradas del factor de crecimiento endotelial 8 presente en el líquido endometrial y del factor inhibidor de la leucemia en las pacientes con infertilidad asociada a la endometriosis.

- ¿Tiene algún efecto en la infertilidad asociada a la endometriosis la actividad de las telomerasas?

- Relación del polimorfismo génico y el haplotipo del factor regulador del interferón 5 en la infertilidad asociada a la endometriosis.

- La endometriosis reduce la expresión de los receptores del factor estimulante de las colonias de granulocitos: un mecanismo que reduce la adrenomedulina estromal vinculada a este factor.

- El tratamiento quirúrgico es una opción excelente para las mujeres que presentan infertilidad asociada a la endometriosis.

- Enumeración y descripción con los factores asociados al pobre resultado de la FIV en términos de nacido vivo, en las mujeres con endometriosis en los estadios III y IV de la enfermedad según la clasificación revisada de la ASRM.

- Asociación entre la endometriosis quirúrgicamente diagnosticada y los resultados adversos en el embarazo.

- El perfil de la expresión de micro-RNA en la infertilidad asociada a la endometriosis y su relación con la receptividad endometrial evaluado por ecografía.

- Expresión aberrante de RNA vinculado al gen *HOXA 11-AS1* y los sitios A (*HOXA 9, 10, 11 y 13*) de los genes en pacientes con endometriosis.

- Evaluación de la ultraestructura del endometrio eutópico en pacientes infértiles con endometriosis y sin ella durante la ventana de implantación. Estudio piloto.

- Análisis de los factores de riesgo para una tasa de recuperación ovocitaria disminuida en la punción aspirativa folicular luego de una estimulación ovárica controlada.

La cuestión de la adenomiosis

Una reciente revisión de Vercellini²⁷ acerca del vínculo entre la infertilidad y la adenomiosis, esto es, la presencia de glándulas y estroma endometriales dentro del espesor del miometrio, destaca que en los últimos años ha demostrado tener, por lo menos en el campo de la FIV, un

impacto negativo. Distintas teorías aplican a esta cuestión. Entre ellas, el efecto dañino causado por los defectos estructurales y funcionales que esta condición provoca tanto en el endometrio eutópico como en el miometrio subendometrial. También altera el sistema uterino de transporte de esperma hacia las trompas debido a la modificación de la peristalsis uterina y los altos niveles de radicales libres presentes en el líquido endometrial. Se ha verificado en estas pacientes una mayor tasa de aborto espontáneo, parto prematuro y rotura prematura de membranas. La utilización de análogos de GnRH durante dos o tres meses antes de un procedimiento de FIV mejoraría los resultados, según datos que no tienen jerarquía suficiente como evidencia médica. Diversas técnicas proponen la cirugía laparoscópica de la adenomiosis, más sencilla de realizar en los casos en que toma forma nodular que en los procesos difusos. La evidencia preliminar sugiere una mejoría de las tasas de embarazo de estas pacientes luego de una cirugía cuidada en manos expertas.

Complicaciones del embarazo de la paciente con endometriosis

No solo tiene dificultad para lograr el embarazo la paciente con endometriosis sino que, además, sus embarazos deben considerarse de "riesgo elevado" debido a una serie de complicaciones más frecuentes en este grupo de mujeres.

Un reciente estudio de cohorte danés, que incluyó a 1.213 mujeres portadoras de la enfermedad que produjeron 1.719 embarazos desde 1989 hasta 2013, recientemente publicado en *Fertility & Sterility*²⁸, puso el foco en la preeclampsia, la incidencia de partos por cesárea, el parto prematuro y las hemorragias puerperales. Destacó que la enfermedad estaba asociada a un mayor riesgo de parto prematuro (riesgo relativo ajustado [RRA] de 1,67 con un intervalo de confianza del 95%), así como a un riesgo aumentado de preeclampsia (RRA de 1,37 con intervalo de confianza del 95%) y necesidad de parto por cesárea (RRA de 1,83 con intervalo de confianza del 95%). Esto se verificó con independencia del empleo o no de técnicas de reproducción asistida para lograr el embarazo. No se encontró un riesgo aumentado de hemorragia puerperal.

Más recientemente, el grupo de Ivo A. Brosens²⁹ presentó un metanálisis acerca de la incidencia del hemoperitoneo espontáneo durante

el embarazo, fenómeno de gravedad que se asocia a muy malos resultados obstétricos. Revisando las publicaciones desde agosto de 2008 hasta septiembre de 2016, se incluyeron en el estudio 44 artículos publicados en los que se describían 59 casos de esta complicación de la gestación, de los cuales 33 ocurrieron en mujeres portadoras de endometriosis (55,9%).

No se encontró una relación demostrable entre la severidad de la complicación y el estadio de la enfermedad. La mayoría de los casos se presentaron en el tercer trimestre del embarazo (50,8%). Los síntomas consistieron en dolor abdominal subagudo, shock hipovolémico y anemia. Se observó sufrimiento fetal en el 40,7% de los episodios.

En la cirugía, el 91,1% de las mujeres tenían sangrado activo y en el 21,6% de los casos este provenía de los implantes endometriósicos. Se comprobó una mortalidad perinatal del 26,9% y una muerte materna.

Este evento es una complicación muy seria del embarazo, particularmente relevante en el caso de las pacientes con endometriosis. No hay hasta el momento medidas preventivas, por lo que se sugiere un control estricto y frecuente de los embarazos en conocimiento de la enfermedad a fin de reconocer oportunamente un episodio de hemorragia intraperitoneal espontánea.

CONCLUSIÓN (Y OPINIÓN)

Varios aspectos básicos hacen a la infertilidad asociada con la endometriosis:

- Daño anatómico.
- Alteraciones de la calidad o maduración ovocitaria y, por ello, mala calidad embrionaria.
- Dificultad para la implantación embrionaria.
- La adenomiosis también contribuye a dificultar el logro del embarazo.
- Los embarazos de las pacientes con endometriosis tienen mayor riesgo.
- El aborto espontáneo es más frecuente en la paciente con endometriosis.

En síntesis, y a modo de conclusión concreta, podríamos decir que la endometriosis, en todas sus formas, es una mala noticia para quien busca un embarazo.

Ninguno de los tratamientos actuales puede revertir completamente estos efectos negativos, a excepción quizá de la cirugía laparoscópica que remueva la totalidad de la enfermedad presente en los estadios iniciales.

Los procedimientos de fertilización asistida de baja y de alta complejidad son útiles a los fines de aumentar las posibilidades de embarazo, mientras que los tratamientos médicos no han demostrado utilidad, salvo antes de la FIV en los casos más severos, además del hecho contradictorio de ser todos anticoncepcionales.

Se discute si es el endometrioma o la cirugía de este lo que afecta la reserva ovárica en estas mujeres. En todos los casos, una cirugía experta, oportunamente indicada, repercute menos sobre este aspecto reproductivo. Deben operarse los endometriomas mayores de 4 cm y la cirugía debe ser completa, esto es, resecaando la totalidad del quiste por su plano de clivaje.

Un pequeño endometrioma de solo 2-3 cm de diámetro se diseca fácilmente y se puede extirpar completo en pocos minutos sin dañar el tejido ovárico circundante. Diferir su cirugía debido al pequeño tamaño 2 o 3 años es una mala praxis que redundará en un daño ovárico causado por el endometrioma o por la cirugía debido a la fibrosis y al mal plano de clivaje que presentan los quistes antiguos.

Todas las pacientes con endometriosis que van a ser sometidas a procedimientos de fertilización asistida deben ser informadas acerca de la menor posibilidad de lograr el embarazo en comparación con las mujeres sin esa afección.

En líneas generales, se debe recomendar no postergar el embarazo toda vez que ello sea posible, porque se trata de una enfermedad evolutiva sin retorno.

La criopreservación de ovocitos en la portadora de endometriosis, una vez diagnosticada y tratada la enfermedad, puede ser un recurso que ayude a lograr el embarazo en tiempos posteriores.

Por sobre todas las cosas, el diagnóstico temprano y el tratamiento inmediato facilitarán el logro del embarazo cuando se lo busque tiempo después. Postergar una laparoscopia aduciendo que la sintomatología dolorosa ha disminuido de intensidad mediante, por ejemplo, la prescripción de píldoras anticonceptivas puede condenar a quien padece endometriosis a presentar más adelante una infertilidad asociada a la endometriosis. No hay edad temprana para indicar una laparoscopia, sí momentos tardíos cuando el daño está presente.

Para finalizar, quiero compartir mi algoritmo personal para el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis (Figura 1).

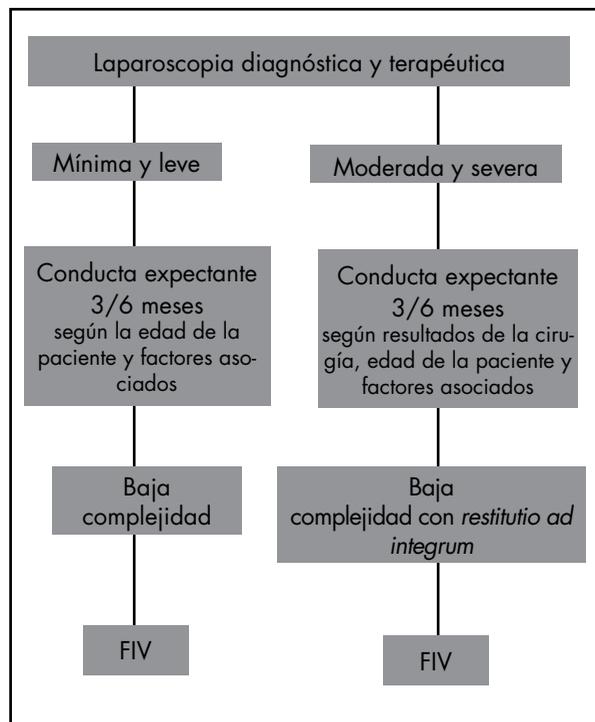


Figura 1: Algoritmo personal para el tratamiento de la infertilidad asociada a la endometriosis.

REFERENCIAS

1. Brosens I, Benagiano G. Is neonatal uterine bleeding involved in the pathogenesis of endometriosis as a source of stem cells? *Fertil Steril* 2013;100(3):622-3.
2. Brosens I, Brosens J, Benagiano G. Neonatal uterine bleeding as antecedent of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 2013;28(11):2893.
3. Domínguez F, Ferrero H, Quiñonero A. Uso de técnicas no invasivas para el diagnóstico de endometriosis, proyecto de investigación. Fundación IVI 2018 (en prensa).
4. Freis A, Dietrich JE, Binder M. Relative morphokinetics assessed by Time-Lapse Imaging. Are altered in embryos from patients with Endometriosis? *Reprod Sci* 2018;25(8):1279-85.
5. Pellicer A, Navarro J, Boschi E, Garrido N, García Velasco J, Remohi J, et al. Endometrial quality in infertile women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001;943:122-30.
6. Vercellini P, Consonni D, Drudi D, Bracco B, Frattaruolo MP, Somigliana ES. Uterine adenomyosis and in vitro fertilization outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2014;29(5):964-77.
7. Werbrouck E, Spiessens C, Meuleman C, D'Hooghe T. No difference in cycle pregnancy rate and in cumulative live-birth rate between women with surgically treated minimal to mild endometriosis and women with unexplained infertility after controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2006;86(3):566-71.
8. Ramalho de Carvalho B, Nakagava HM, Amaral Silva A, Paes Barbosa AC. An overview of non-obstructive etiopathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. *JBRA Assist Reprod* 2010;14(4):43-6.

9. Lemos NA, Arbo E, Scalco R, Weiler E, Rosa V, Cunha-Filho JS. Decreased anti-Müllerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril* 2008;89(5):1064-8.
10. Hock DL, Sharafi K, Dagostino L, Kemmann E, Seifer DB. Contribution of diminished ovarian reserve to hypofertility associated with endometriosis. *J Reprod Med* 2001;46(1):7-10.
11. Abreu LG, Romão GS, Reis RM, Ferriani RA, Sá MFS, Moura MD. Reduced aromatase activity in granulosa cells of women with endometriosis undergoing assisted reproduction techniques. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:432-6.
12. Miller DL, Jones CJ, Aplin JD, Nardo LG. Altered glycosylation in peri-implantation phase endometrium in women with stages III and IV endometriosis. *Hum Reprod* 2010;25:406-11.
13. Campos Petean C, Ferriani RA, Dos Reis RM, De Moura MD, Jordão AA Jr, Navarro PA. Lipid peroxidation and vitamin E in serum and follicular fluid from infertile women with peritoneal endometriosis submitted to controlled ovarian hyperstimulation: a pilot study. *Fertil Steril* 2008;90:2080-5.
14. Johnson NP, Hummelshoj L. Consensus on current management of endometriosis. World Endometriosis Society Montpellier Consortium. *Hum Reprod* 2013;28(6):1552-68.
15. Kitajima M, Defrère S, Dolmans M, Colette S, Squifflet J, Van Langendonck A, et al. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis. *Fertnstert* 2011;96(3):685-91.
16. Somigliana E, Berlanda N, Benaglia L, Viganò P, Vercellini P, Fedele L. Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: a systematic review on serum antimüllerian hormone level modifications. *Fertnstert* 2012;98(6):1531-8.
17. Vignali M, Mabrouk M, Ciocca E, Alabiso G, Barbasetti di Prun A, Gentilini D, et al. Surgical excision of ovarian endometriomas: Does it truly impair ovarian reserve? Long term anti-Müllerian hormone (AMH) changes after surgery. *J Obstet Gynaecol* 2015;41(11):1773-8.
18. D'Hooghe T, Denys B, Spiessens C, Meuleman C, Debrock S. Is the endometriosis recurrence rate increased after ovarian hyperstimulation? *Fertil Steril* 2006;86(2):283-90.
19. Hughes E, Brown J, Collins JJ, Farquhar C, Fedorkow DM, Vanderkerchove P. Ovulation suppression for endometriosis for women with subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;3:CD000155.
20. Reilly SJ, Stewart AW, Prentice LR, Johnson NP. Lipiodol uterine bathing effect for enhancing the results of in vitro fertilization, a pilot randomized trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2014;54(1):9-12.
21. Johnson NP, Farquhar CM, Hadden WE, Suckling J, Yu Y, Sadler L. The FLUSH trial-flushing with lipiodol for unexplained (and endometriosis-related) subfertility by hysterosalpingography: a randomized trial. *Hum Reprod* 2004;19:2043-51.
22. ASRM Practice Committee. Endometriosis and Infertility: A Committee Opinion. *Fertnstert* 2012;98:591-8.
23. Garrido N, Navarro J, García-Velasco J, Remoh J, Pellicer A, Simón C. The endometrium versus embryonic quality in endometriosis-related infertility. *Hum Reprod Update* 2002;8(1):95-103.
24. ESHRE. Guideline on the management of women with endometriosis. September 2013. <https://www.eshre.eu/guidelines-and-legal>
25. RCOG. Endometriosis and Infertility. <https://www.rcog.org.uk/>
26. Leyland N, Casper R, Laberge P, Singh SS, Allen L, Arendas K, et al. Endometriosis: diagnosis and management. *J Obstet Gynaecol Can* 2010;32(7/2):S1-32.
27. Monyi E, Gattei U, Dridi D, Vercellini P, Bugaglio L. Adenomyosis: fertility and obstetric outcome. A comprehensive literature review. *Minerva Ginecologica* 2017;7(26):4163-6.
28. Tølbøll Glavind M, Forman A, Håkonsen Arendt L, Nielsen K, Henriksen TB. Endometriosis and pregnancy complications: a Danish cohort study. *Fertil Steril* 2017;107(1):160-6.
29. Lier MCI, Malik RF, Ket JCF, Lambalk CB, Brosens IA, Mijatovic V. Spontaneous hemoperitoneum in pregnancy (SHIP) and endometriosis-A systematic review of the recent literature. *EJOGRB* 2017;219:57-65.

ACTUALIZACIÓN

Diagnóstico genético del síndrome de Turner

Genetic diagnosis of Turner syndrome

Malena Cavanna y Bárbara De Nardo

Sección Endocrinología Ginecológica, Servicio de Ginecología, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto de las autoras: Malena Cavanna y Bárbara De Nardo

E-mail: malena.cavanna@hospitalitaliano.org.ar, barbara.denardo@hospitalitaliano.org.ar

Correspondencia: Hospital Italiano de Buenos Aires. Pres. Tte. Gral. Juan Domingo Perón 4190 (1199ABB).

Recibido: 13/8/2018 Aceptado: 13/9/2018

Conflicto de interés: las autoras declaran no tener conflicto de interés.

Resumen

El síndrome de Turner (ST) es una alteración cromosómica que afecta el fenotipo de las mujeres que tienen un cromosoma X intacto y la ausencia completa o parcial (mosaico) del segundo cromosoma sexual asociados con una o más manifestaciones clínicas. En un 60% de los casos se debe al cariotipo 45,XO. Su verdadera prevalencia se desconoce, ya que muchas pacientes no son diagnosticadas o lo son de manera tardía debido a la variabilidad fenotípica y a la falta de criterios diagnósticos estrictos.

Mientras la gran mayoría de las pacientes tienen estatura baja aislada o solo algunos rasgos característicos, menos del 10% de ellas presentan el cuadro clínico clásico. El fenotipo expresado dependerá del mosaicismo del cromosoma sexual o de las anomalías estructurales de este cromosoma.

Palabras clave: síndrome de Turner, diagnóstico genético, anomalías cromosómicas, mosaicismo.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV N° 2 Diciembre de 2018: 59-69

Abstract

Turner syndrome is a chromosomal abnormality characterized by a great variability of clinical manifestations caused by loss of part or all of an X chromosome. Approximately 60% of the cases corresponds to 45,XO karyotype. Its real prevalence is uncertain, due to a late diagnosis as a consequence of the wide phenotypic variability and the lack of strict diagnostic criteria.

While the great majority is characterized by short stature or only a few characteristic features, less than 10% of patients present the classic clinical picture. The phenotype expressed will depend on the mosaicism of the sexual chromosome or its structural anomalies.

Key words: Turner syndrome, genetic diagnosis, chromosomal abnormalities, mosaicism.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV N° 2 Diciembre de 2018: 59-69

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades genéticas pueden estar causadas por mutaciones genéticas (alteraciones que afectan la secuencia del DNA), mutaciones genómicas (alteración estructural o numérica de un fragmento de un cromosoma), anomalías cromosómicas (alteraciones de grandes regiones de un cromosoma o de un cromosoma completo) o mutaciones epigenéticas (modificaciones químicas sobre la secuencia del DNA)¹.

Las anomalías cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales. Las alteraciones numéricas constituyen cambios en la cantidad total o individual de los cromosomas e incluyen la aneuploidía, que es la adición o pérdida de un cromosoma, lo que da como resultado una trisomía o una monosomía, respectivamente. Entre las aneuploidías que afectan a los cromosomas sexuales se encuentran la monosomía del cromosoma X (45,XO), causante del síndrome de Turner (ST), y la disomía del cromosoma X en el varón (47,XXY), causante del síndrome de Klinefelter¹.

Las alteraciones cromosómicas estructurales pueden ser equilibradas, cuando se conserva el contenido de material genético, o desequilibradas, cuando hay una pérdida o ganancia de este. Incluyen las deleciones, duplicaciones, translocaciones, inserciones e inversiones, así como otros reordenamientos, como los isocromosomas y los cromosomas marcadores¹.

Todas las alteraciones mencionadas pueden encontrarse en un porcentaje variable de células de un individuo y no en todo su organismo¹. Esto se conoce con el nombre de mosaicismo,

en el que coexisten más de dos líneas celulares con diferente genotipo.

El ST es una alteración cromosómica que afecta el fenotipo de mujeres que tienen un cromosoma X intacto y la ausencia completa o parcial (mosaico) del segundo cromosoma sexual asociados con una o más manifestaciones clínicas². En un 60% de los casos se debe al cariotipo 45,XO.

Afecta a cerca de 1/2.000-2.500 recién nacidas con fenotipo femenino, según datos epidemiológicos de Europa, Japón y Estados Unidos³, aunque la verdadera prevalencia se desconoce, ya que muchas pacientes no son diagnosticadas o lo son de manera tardía, debido a la variabilidad fenotípica y a la falta de criterios diagnósticos estrictos.

Mientras la gran mayoría tienen estatura baja aislada o solo algunos rasgos característicos, menos del 10% de las pacientes presentan el cuadro clínico clásico. El fenotipo expresado dependerá del mosaicismo del cromosoma sexual o de las anomalías estructurales de este.

La estatura baja y la insuficiencia ovárica primaria (IOP) son características típicas que se presentan en > 90% de los casos de ST. Otras afecciones, como la displasia esquelética (como el cúbito valgo y el cuarto o quinto metacarpiano acortado), defectos cardíacos, anomalías faciales características (incluida la implantación baja de las orejas y del pelo), anomalías estructurales renales y deficiencia auditiva, también se han observado en las pacientes con ST, mientras que el retraso mental rara vez ocurre.

EXPRESIÓN FENOTÍPICA DE LAS ALTERACIONES EN EL CARIOTIPO

El cariotipo en el ST comprende desde la monosomía del cromosoma X hasta diferentes formas de mosaicismo, en la que hay una línea celular normal y una segunda (o tercera) línea celular anormal en la mujer (Tabla 1).

La correlación entre los diferentes cariotipos y sus respectivos fenotipos es dificultosa, debido a las diferencias en las edades de las pacientes en el momento del diagnóstico, las diversas características clínicas y la variabilidad de la extensión del mosaicismo en los diversos tejidos².

La expresión fenotípica del ST se puede explicar sobre la base de tres teorías: estado de haploinsuficiencia de los genes que normalmente se expresan en los dos cromosomas sexuales y que escaparía al fenómeno de inactivación, fenómeno de *imprinting* que modifica la expresión del gen en función de su procedencia paterna o materna, y efectos inespecíficos secundarios al desequilibrio cromosómico⁴.

Si bien en una paciente individual el cariotipo específico no siempre predice el fenotipo, se podrían realizar varias generalizaciones:

- 45,X-45,X (monosomía X): se encuentra en el 45-50% de las mujeres con ST. En la mayoría de los casos el cromosoma X perdido es de origen paterno. Se estima que solo el 1% de los embarazos llega a término, ya que la mayoría terminan en abortos espontáneos⁴.

- 45,X mosaicismo: alrededor de un 50% de las pacientes tienen un cromosoma complementario con mosaicismo: 45,X/46,XX o 45,X/47,XXX o 45,X mosaico con las anomalías cromosómicas nombradas más adelante.

Cariotipo	Frecuencia	Descripción
45,X	40-50%	Monosomía X
45,X/46,XX	15-25%	Mosaicismo
45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX	3%	Mosaicismo con triple X
45,X/46,XY	10-12%	Disgenesia gonadal mixta
46,XX del (P22,3); 46,X,R(X)/46,XX	10-12%	Deleción Xp22.3 Cromosoma X en anillo
46,X I(XQ); 46,X idic (XP)	~10	Isocromosoma Xq; isodicéntrico Xp
Transloc. autosómica X desbalanceada	Raro	Varios
46,XX, del (Q24)	Raro	No ST, IOP
46,X, idic (X) (Q24)	Raro	No ST, isodicéntrico Xq24

Tabla 1: Tipo y frecuencia de las anomalías cromosómicas en el síndrome de Turner^{2,3}.

La presencia y el grado de mosaicismo varían en los diferentes tejidos; por lo tanto, ante un cariotipo normal en la sangre periférica con sospecha clínica de ST no se descarta la patología. El fenotipo clínico de estas pacientes es a menudo más moderado en comparación con el observado en las pacientes con monosomía del cromosoma X, aunque esto dependerá de los tejidos afectados por el mosaicismo:

- 45,X/46,XX: se asocia con menor prevalencia y menor gravedad de enfermedades cardíacas congénitas y anomalías linfáticas². Si bien tienen la posibilidad de embarazarse de manera espontánea, presentan una alta incidencia de abortos tempranos.
- 45,X/47,XXX: el fenotipo de estas pacientes es menos marcado que el previamente descrito².
- 45,X/anomalías cromosómicas:
 - ✓ Isocromosoma X: es una anomalía estructural del cromosoma X. Se caracteriza por la ausencia de brazos largos y duplicación de los brazos cortos (46X, i(Xp)) o viceversa (46X, i(Xq)). Por lo tanto, da lugar a una monosomía parcial para el brazo perdido y una trisomía parcial para el brazo duplicado⁵.
 - ✓ Cromosoma en anillo X (rX): se presenta cuando los extremos de los brazos se unen, con pérdida de material genético (46X, r(X)). Esta anomalía es funcionalmente similar a una deleción de la parte distal del brazo corto (deleción Xp)⁵. Puede asociarse a grados variables de discapacidad intelectual y puede dar lugar a un fenotipo no clásico².
 - ✓ Xp o Xq deleción: en algunas pacientes hay pérdida total o parcial de una porción del brazo corto o largo del cromosoma X (del (X)p o q)⁵. Si una mujer tiene únicamente células con una deleción terminal Xq, se podría manifestar solo como IOP, sin presentar otras características del síndrome de Turner².
- 45,X/46,XY: alrededor de un 10% de todos los individuos con fenotipo de ST pueden presentar un mosaicismo que involucra la línea celular Y. Este diagnóstico puede ser por un hallazgo en el cariotipo o porque la paciente presenta algún signo de virilización. Es importante determinar la presencia del cromosoma Y, ya que se cree que la

región crítica en el desarrollo del gonadoblastoma se localiza en el brazo corto de este cromosoma, lo que aumenta el riesgo de padecerlo⁶. La importancia radica en el riesgo de progresión a disgerminoma con potencial metastásico⁷.

El amplio espectro del fenotipo presente en el ST indica que diferentes genes localizados en el cromosoma X son responsables de él. Pequeñas deleciones del cromosoma X pueden causar diversas alteraciones, pero no necesariamente se encuentran incluidas en la definición del ST².

Las mujeres con pequeñas deleciones distales del brazo corto del cromosoma X (Xp22.3) donde se encuentra el gen *SHOX* (*short stature homeobox*) suelen tener estatura baja y otras anomalías esqueléticas. No parecen estar relacionadas con mayor incidencia de anomalías cardíacas, trastornos neuropsiquiátricos o IOP, como sí en la monosomía del X². La haploinsuficiencia del gen *SHOX*, implicada en la talla baja del síndrome, se localiza en la región pseudoautosómica de los cromosomas sexuales. Se expresa activamente en los tejidos osteogénicos y se encuentra delecionado en la discondrosteosis, que se asocia a talla baja y a la malformación de Madelung, o síndrome de Léri-Weill. La talla baja del ST obedece primordialmente a la haploinsuficiencia del gen *SHOX*, aunque hay locus adicionales que la regulan⁹.

Por el contrario, las deficiencias neurocognitivas típicas de 45,X son comunes en las niñas con deleciones citogenéticamente visibles de Xp22.3, aunque este puede no ser el caso de las niñas con deleciones submicroscópicas de Xp22.3 detectadas solo por citogenética molecular o estudios de micromatrices (*microarrays*)².

Las mujeres con una deleción distal a Xq24 suelen tener amenorrea primaria o secundaria (IOP), sin estatura baja u otras características del ST². La región crítica del cromosoma X que se relaciona con disgenesia gonadal involucra los segmentos del brazo largo entre las bandas q13 a q22 y q22 a q26, separadas por una pequeña región en Xq22 donde, si la alteración ocurre dentro de ella, no se produce la patología¹⁰.

Aunque no hay hallazgos genéticos que expliquen la afectación visceral y de los tejidos blandos, algunos datos fenotípicos, como el linfedema, el *pterygium colli* y las anomalías cardíacas, se han asociado con la hipoplasia linfática

relacionada con genes que escapan a la inactivación del cromosoma X próximos a la región Xp 11.3. Hay varios genes relacionados con la disgenesia gonadal, como *DDFRX* (*Drosophila fat facets related X*) en la región Xp 11.4, *ZFX* (*zinc finger X*) en la región distal Xp, y los genes *RPS4X* (gen que codifica una isoforma de la proteína ribosómica S4) y *DIAPH2* (gen necesario para una normal función ovárica) que mapean en Xq⁴.

La haploinsuficiencia de ciertos genes del cromosoma X podría ser la causa de la autoinmunidad debido a la falta de exposición de proteínas antigénicas al timo y el consiguiente escape de las células T autorreactivas. Entre los trastornos autoinmunes asociados con ST se reconocen: la tiroiditis de Hashimoto (alrededor del 50% de las pacientes), que presenta asociación con los genes *PTPN22* y *ZFAT*; la enfermedad celíaca (alteración del gen *MYO9B*), y las enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn)¹¹.

Aún no se han encontrado los genes específicos para los defectos cardíacos; sin embargo, se cree que estarían ubicados en el brazo corto del cromosoma X¹².

El efecto mecánico del linfedema fetal durante el desarrollo contribuiría a malformaciones esqueléticas, *pterygium colli* y, probablemente, a malformaciones del oído, anomalías renales y ciertos defectos cardíacos, aunque el mecanismo genético del linfedema grave aún no se ha dilucidado¹³.

Se encuentran excluidas del diagnóstico de ST las pacientes con fenotipo masculino (45,X/46,XY u otra variante) y las mayores de 50 años con menos del 5% de sus células 45,X, ya que el proceso de envejecimiento normal puede desarrollar mosaicismo 45,X².

SOSPECHA CLÍNICA Y CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA Prenatal

Alrededor de 1-2% de los embarazos tienen un cariotipo 45,X. En la mayoría de los casos de mosaicismo 45,X/46,XX nace un recién nacido con fenotipo femenino normal⁷.

El diagnóstico prenatal consta de dos etapas: la sospecha basada en los signos ecográficos y en las determinaciones bioquímicas, y la confirmación, ya sea en la sangre materna a través de la detección del DNA fetal o mediante técnicas invasivas.

Es importante destacar que, aun encontrándose tanto la ecografía como el laboratorio dentro de los parámetros normales, no se descarta la presencia de enfermedad, y que los resultados anormales de estas pruebas tampoco son confirmatorios; es decir, para hacer el diagnóstico de certeza hay que recurrir a análisis específicos. En primera instancia, la confirmación del cariotipo de ST es obligatoria².

El resultado posnatal y el cariotipo constitucional de las pacientes con ST diagnosticado prenatalmente son inciertos, especialmente en los casos de mosaicismo. Por este motivo, se debe repetir el análisis cromosómico² en todas las pacientes después del nacimiento.

Una situación que merece especial atención es el cribado genético preimplantacional (*pre-implantation genetic screening*, PGS), el cual se está utilizando con mayor frecuencia debido a los tratamientos de fertilidad. Este se basa en el análisis genético de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* (FIV) o por inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IIE), que permite la detección de aneuploidías, translocaciones, inversiones y enfermedades monogénicas. Se lo ofrece a las parejas con historia de enfermedades monogénicas (autosómicas dominantes o recesivas y ligadas al cromosoma X) y anomalías cromosómicas numéricas y estructurales conocidas. También a las parejas con abortos de repetición inexplicados o con fallas reiteradas de implantación después de tratamientos de reproducción asistida. Otra indicación son las mujeres con edad materna avanzada (prevención de anomalías cromosómicas [trisomías]). De utilizarse de manera extensiva en un futuro, tendría un importante impacto sobre la prevalencia del ST^{2,14}.

¿Cuándo estudiar?

El diagnóstico prenatal tiene como finalidad diagnosticar con la mayor precocidad posible un defecto congénito o bien establecer la ausencia de este¹⁵ para actuar en consecuencia y evitar futuras complicaciones.

La prevalencia de anomalías cromosómicas en recién nacidos en la Argentina, según el informe anual de anomalías congénitas 2016, es de 1,53%¹⁶. La trisomía 21 representa más del 50% de los casos; el 15%, a la trisomía 18; aproximadamente el 12% son anomalías como 45,X; 47,XXX/XXY/YYY, y la trisomía 13, el 5%¹⁷.

Si bien las pruebas diagnósticas para la detección de estas anomalías cromosómicas deberían ser una opción en todos los embarazos, existe un grupo de alto riesgo constituido por aquellas gestantes que tienen¹⁵:

- Factores de riesgo preconceptionales, como un hijo previo con cromosomopatía documentada, progenitor portador de una anomalía cromosómica o edad materna avanzada (≥ 40 años). Otros potenciales factores de riesgo preconceptionales, como el aborto de repetición, pueden considerarse indicación de un estudio invasivo cuando el estudio histológico del aborto o de los padres muestre la presencia de una anomalía cromosómica.

- Factores de riesgo prenatales: sospecha de la presencia de una cromosomopatía fetal a partir de la aplicación de un programa de cribado prenatal de alteraciones cromosómicas fetales.

Finalmente, el motivo puede no ser una indicación médica, sino la decisión de los progenitores.

Es importante destacar que el diagnóstico prenatal debe acompañarse del asesoramiento genético, que puede proporcionar a cada mujer la información necesaria sobre sus riesgos específicos. La eficacia del asesoramiento genético contempla el logro de la comprensión total de la patología tanto en su pronóstico como en su recurrencia en futuros embarazos, acompañando en la toma de decisiones, además de otorgar la capacidad para enfrentar el problema¹⁸.

Detección durante el primero y el segundo trimestres

A principios de 1990, el trabajo de Nicolai et al. demostró que la detección ecográfica al final del primer trimestre de una simple acumulación de líquido translúcido detrás del cuello del feto –translucidez nucal (TN)– estaba fuertemente asociada a aneuploidía fetal. La detección de aneuploidía fue tan exitosa que la medición de la TN se convirtió en una indicación específica para la ecografía del primer trimestre, y es válida entre las 11 y las 14 semanas de gestación¹⁹. Otros hallazgos ecográficos sugestivos de ST son la coartación de la aorta o los defectos cardíacos del lado izquierdo (que deben evaluarse mediante ecocardiografía fetal), la braquicefalia, las anomalías renales, el polihidramnios, el oligohidramnios y la restricción del crecimiento intrauterino².

El higroma quístico es una malformación venolinfática que se visualiza ecográficamente

como un espacio hipoecoico septado detrás del cuello y se extiende a lo largo de la espalda. Siempre que sea posible, es útil diferenciar el higroma quístico del aumento de la TN, ya que el higroma quístico en el primer trimestre quintuplica el riesgo de aneuploidía junto con un mayor riesgo de anomalías cardíacas¹⁹.

Además de las trisomías autosómicas comunes, el aumento de la TN se asocia con otras aneuploidías y síndromes genéticos, especialmente anomalías cardíacas fetales. Frente a un valor de TN mayor de 3 mm, es imperioso ofrecer una ecografía dirigida, con ecocardiografía fetal o sin ella, entre las semanas 18 y 22 de gestación¹⁹, y el análisis sérico de la madre.

La detección durante el primer trimestre combina la TN con la determinación de la gonadotropina coriónica humana (HCG) en el suero materno y la proteína A asociada al embarazo (PAPP-A). Si las detecciones en el suero y la TN se combinan con una prueba de detección cuádruple de marcadores en el segundo trimestre, la detección de aneuploidía será significativamente mayor.

La detección en el suero de niveles anormalmente elevados de HCG e inhibina y de niveles ligeramente disminuidos de alfafetoproteína y estríol no conjugado se asocia con una mayor probabilidad de diagnóstico de ST.

Resumiendo, la detección integrada incluye la TN ecográfica y la determinación de HCG y PAPP-A en el suero entre las semanas 11 y 14 de gestación, seguidas de la prueba cuádruple de marcadores de alfafetoproteína (AFP), HCG, estríol no conjugado e inhibina A entre las semanas 15 y 21. Estos siete parámetros se integran para calcular un solo riesgo y la sensibilidad es mayor en comparación con cualquiera de las pruebas de detección tradicionales. En el ST suele observarse un valor relativamente normal de PAPP-A (0,99 MoM) y un leve incremento del valor de HCG (1,2 MoM).

Detección del DNA fetal libre en la sangre materna

Introducida en 2011, es una prueba excelente, en particular para las trisomías fetales 21, 18 y 13, y para las aneuploidías del cromosoma sexual. La prueba de detección del DNA fetal libre identifica fragmentos de DNA circulantes que son principalmente de origen placentario y del trofoblasto¹⁹. Hay tres métodos de detección del DNA fetal

libre en las aneuploidías: secuenciación del genoma completo, también denominado secuenciación masiva paralela o de escopeta; secuenciación selectiva (o dirigida) del cromosoma; y análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). La detección puede realizarse en cualquier momento del embarazo después de las 9 o 10 semanas de gestación y los resultados están disponibles casi siempre en 7 a 10 días¹⁹. Si se elige la detección mediante DNA fetal libre, se debe realizar el cribado de defectos del tubo neural durante el segundo trimestre por separado, ya sea con evaluación de la AFP en el suero materno o con ecografía. La detección mediante DNA fetal libre tiene una sensibilidad más alta y un menor índice de falsos positivos que las modalidades de detección tradicionales¹⁹. Un reciente metanálisis de 37 estudios de detección de DNA fetal libre en embarazos de alto riesgo demostró, en la detección de ST, una sensibilidad aproximada del 90%, con una especificidad del 99,8%²⁰. La placenta y el feto no siempre tienen el mismo complemento cromosómico. Los resultados falsos positivos pueden ocurrir cuando existe mosaicismo placentario confinado o muerte temprana de un gemelo aneuploide. Además, dado que la detección del DNA fetal libre analiza el DNA placentario y materno, hubo casos de mosaicismo materno con el consecuente resultado falso positivo².

Una diferencia importante entre la detección del DNA de células libres y la detección tradicional es que algunos laboratorios informan los resultados del análisis como positivos o negativos, o como una categoría diversamente denominada *no-call*, indeterminada o no interpretable¹⁹. Esta última categoría comprende un 48% de los embarazos estudiados y puede ser consecuencia de una falla en el estudio, una alta variación en el estudio o una fracción fetal demasiado baja.

La fracción fetal es la proporción total de DNA fetal libre de origen placentario (el resto es materno) y, por lo general, es de un 10%. Una fracción fetal baja, definida por debajo del 4%, confiere un riesgo significativamente mayor de aneuploidía fetal. Si una prueba de detección de DNA fetal libre arroja un resultado de baja fracción fetal o un *no-call*, estaría indicada la asesoría genética y se debe ofrecer la amniocentesis¹⁹. También se recomienda la ecografía dirigida, pero no es un sustituto de la amniocentesis, ya que no está claro cuál es el riesgo residual de aneuploidía después de una ecografía normal.

La detección de DNA fetal libre puede utilizarse como una prueba de detección primaria o como una prueba de detección secundaria. Debido a su alta sensibilidad y bajo índice de falsos positivos, se la puede ofrecer a las mujeres que reciben un resultado positivo en una prueba de detección tradicional y que preferirían una prueba de detección secundaria antes de considerar o de proceder a una prueba diagnóstica. Las decisiones de manejo, como la interrupción del embarazo, no deben basarse en los resultados de ninguna prueba de detección¹⁹.

Se recomienda efectuar el diagnóstico prenatal cuando una prueba de detección de aneuploidía es anormal.

Técnicas invasivas

Permiten completar el diagnóstico de numerosas afecciones fetales. Por su carácter invasivo, no están exentas de complicaciones y conllevan cierto riesgo de interferir en la evolución de la gestación. Por lo tanto, es esencial seleccionar los casos que pueden beneficiarse de su realización. Las técnicas invasivas más empleadas son la biopsia de las vellosidades coriónicas (BVC), la amniocentesis (AC) y la cordocentesis¹⁵.

La BVC consiste en la extracción de una muestra de trofoblasto por vía transcervical (BC-TC) o transabdominal (BC-TA). Permite estudios citogenéticos, moleculares y bioquímicos¹⁵. Se la considera la técnica de elección cuando es necesario estudiar el cariotipo fetal antes de la semana 15 de gestación. Las técnicas de laboratorio vigentes pueden ser el método directo (procesamiento inmediato) o semidirecto (incubación entre 24 horas y 3 días), que estudian células ya en división presentes en el trofoblasto, o el cultivo largo, que genera células procedentes del mesénquima vellositario y que puede prolongarse entre 2 y 3 semanas.

El estudio realizado a partir de las vellosidades coriónicas proporciona un resultado válido en el 99% de los casos y tiene un elevadísimo grado de precisión. En el 1% restante es necesario recurrir a otra técnica invasiva, debido a contaminación materna, fracaso del cultivo o tener resultados citogenéticos ambiguos. La segunda fuente potencial de errores diagnósticos es la presencia de un mosaicismo confinado a la placenta, una discordancia poco frecuente¹⁵.

La amniocentesis es un procedimiento de diagnóstico prenatal invasivo del segundo tri-

mestre. Consiste en la introducción de una aguja espinal a través de la pared abdominal, la pared uterina y la cavidad amniótica bajo guía ecográfica continua, de forma que se pueda aspirar una muestra del líquido amniótico que envuelve al feto y que contiene células de origen fetal²¹. Se realiza a partir de las 16 semanas de gestación y en el líquido amniótico se pueden efectuar estudios cromosómicos, bioquímicos, moleculares o microbiológicos. Su eficacia se demostró en diversos estudios multicéntricos, en los que se comprobó una precisión diagnóstica superior al 99%¹⁵. El procedimiento conlleva un riesgo mínimo de pérdida fetal del 0,5% cuando se realiza en el segundo trimestre, después de la fusión de la membrana amniótica con el corion, además de un riesgo menor de otras complicaciones, como pérdida de líquido amniótico (0,3%), hemorragia placentaria, infección intraamniótica, hematoma de la pared abdominal o traumatismo fetal²¹.

La cordocentesis es el método más utilizado para la obtención de sangre fetal. Debe realizarse a partir de la semana 20. Según la ubicación de la placenta y la inserción del cordón, la punción puede ser transplacentaria o extraplacentaria; el lugar ideal de punción es la vena umbilical, a 1 cm de la inserción placentaria¹⁵. La mayoría de las cordocentesis se indican para el estudio del cariotipo fetal cuando la sospecha de cromosomopatía se establece tardíamente.

La sangre fetal proporciona resultados completos en un menor espacio de tiempo; permite resolver dudas diagnósticas generadas tras una BVC o una AC, dado que su seguridad diagnóstica es mayor que la de las vellosidades coriónicas y la del líquido amniótico¹⁵.

Posnatal

Si bien la monosomía X se diagnostica en un 45% de las pacientes con ST en la infancia temprana⁷, la ausencia o el retraso en el diagnóstico sigue siendo un problema importante. Aunque ningún hallazgo clínico aislado es específico, confieren en conjunto un fenotipo muy característico que, en los casos típicos, casi es suficiente para hacer el diagnóstico.

Para el diagnóstico del ST, se realiza un cariotipo a las mujeres que presenten uno o más de los siguientes signos: estatura baja, *pterygium colli*, linfedema en los miembros, coartación de la aorta y pubertad tardía⁶. Así como también el

análisis citogenético para cualquier mujer que presente estatura baja (-2 DE) o por debajo del potencial de crecimiento genético.

El último consenso internacional sobre el ST (*Turner Syndrome Consensus Study Group, 2007*) recomendó que se considere el diagnóstico en toda mujer con estatura baja o pubertad tardía, o que presente cualquiera de los siguientes hallazgos clínicos: edema de manos o pies; pliegues nucales; anomalías cardíacas del lado izquierdo, especialmente coartación de la aorta o corazón izquierdo hipoplásico; línea delgada baja; orejas bajas; mandíbula pequeña; estatura baja con crecimiento a una velocidad inferior al percentil 10 para la edad; niveles notablemente elevados de FSH; cúbito valgo; hipoplasia ungueal; uñas hiperconvexas elevadas; múltiples nevos pigmentados; facies característica; cuarto metacarpiano corto; paladar alto arqueado, u otitis media crónica⁶ (Tabla 2).

<p>Neonatal</p> <ul style="list-style-type: none"> Linfedema de pies o manos Mamilas lateralizadas y tórax ancho <i>Pterygium colli</i> Implantación baja del pelo y las orejas Retromicrognatia Moderada restricción del crecimiento intrauterino Cardiopatía congénita del lado izquierdo
<p>Infancia</p> <ul style="list-style-type: none"> Retraso del crecimiento progresivo Estigmas turnerianos: cúbito valgo, paladar ojival, cara triangular, hipoplasia ungueal, nevos pigmentados, acortamiento del cuarto metacarpiano Otitis de repetición/hipoacusia Osteoporosis carpiana con aspecto reticular
<p>Adolescencia</p> <ul style="list-style-type: none"> Ausencia de desarrollo puberal Maduración ósea retrasada Talla baja
<p>Adulthood</p> <ul style="list-style-type: none"> Amenorrea secundaria/IOP Infertilidad

Tabla 2: Diagnóstico clínico en función de la edad⁴.

De particular importancia es el caso de las pacientes que presentan mosaicismo 45,X/46,XX leve, ya que la sospecha clínica suele surgir de manera tardía, al debutar estas pacientes con una amenorrea secundaria, cuya causa es la insuficiencia ovárica precoz.

Se caracteriza por un proceso de declinación continua de la función ovárica en las jóvenes, que determina un estado de menopausia más temprano que el promedio. Se presenta en mujeres menores de 40 años, con amenorrea secundaria hipergonadotrófica > 4 meses (2 determinaciones de FSH > 40 mUI/ml separadas por un mes)

y el consecuente hipoestrogenismo, con una función ovárica intermitente. El valor de corte de la FSH para realizar el diagnóstico se encuentra en revisión. En 2015, la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología modificó el valor de FSH a dos determinaciones > 25 mUI/ml²². Es una entidad altamente heterogénea tanto en el fenotipo como en la etiología. El factor genético se ha considerado un componente importante en su fisiopatología²³. Los estudios indican que 10-12% de las mujeres con diagnóstico de IOP tienen anomalías cromosómicas, la mayoría (94%) de las cuales son anomalías cromosómicas X (estructurales o aneuploidía). No hay ninguna deficiencia genética dominante que haya sido relacionada con IOP, siendo esta de naturaleza poligénica. En conjunto, se han identificado más de 80 genes candidatos y un 25% de estos fueron validados para ser funcionalmente causales. Sin embargo, estas deficiencias genéticas identificadas solo representan una pequeña proporción de las pacientes con IOP²³. En estas pacientes, la estatura baja, la necesidad de utilizar técnicas de reproducción asistida y la presencia de otras características dismórficas del síndrome de Turner deberían considerarse para recomendar el estudio del cariotipo a fin de confirmar el diagnóstico. Según la Sociedad Internacional de Menopausia²⁴, en las mujeres menores de 30 años con IOP es obligatorio el estudio del cariotipo para su diagnóstico y la prevención de las probables complicaciones asociadas.

ALTERNATIVAS DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

Métodos diagnósticos: citogenética y genética molecular

El análisis citogenético proporciona información del genoma y puede revelar cambios en el número de los cromosomas (aneuploidías) y cambios estructurales más delicados (como deleciones, duplicaciones, translocaciones e inversiones cromosómicas). En genética médica, el análisis citogenético se está convirtiendo en una fuente esencial de diagnóstico y evaluación de defectos congénitos específicos, trastornos genéticos, retraso en el desarrollo, discapacidades intelectuales e, incluso, cánceres¹⁸. La elección de la técnica molecular se basará en la sospecha diagnóstica, el conocimiento de la causa genética más frecuente, la resolución de la técnica y sus ventajas y limitaciones.

La identificación del mosaicismo en el ST varía con el método de determinación, que es del 34% con las técnicas citogenéticas convencionales, del 60% con las técnicas de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y del 74% si se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cariotipo

El cariotipo es una técnica citogenética muy fiable para la detección de las anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. Tiene una resolución para detectar ganancias, pérdidas o cambios de posición de 5-10 Mb de material genético y no permite detectar alteraciones de número de copia o estructura de menor tamaño. Al analizar numerosas células de manera individual, el cariotipo permite detectar mosaicismo para las alteraciones cromosómicas visibles, inversiones y translocaciones balanceadas (sin pérdida ni ganancia de material genético), siempre que se encuentren dentro del límite de resolución¹. La detección se realiza en linfocitos de sangre periférica, tras cultivo durante 72 horas y diversos tratamientos, con posterior estudio en el microscopio de un mínimo de 30 células en metafase, ampliado a 50 en el caso de los mosaicismos³, según las recomendaciones del Colegio Americano de Medicina Genética⁷.

Si el cariotipo inicial es normal en una paciente con fuerte sospecha clínica de ST, es imprescindible un segundo cariotipo que debe utilizar un tejido diferente, como la piel. Este fenómeno puede atribuirse a que las líneas celulares anormales, al envejecer, sufren apoptosis en la médula ósea y dejan la línea celular normal en la sangre periférica²⁵. Además, como ya se dijo, el mosaicismo puede distribuirse de manera variable entre los distintos tejidos.

Existen diversas situaciones en las que es necesario repetir el cariotipo: en todas las niñas en quienes se haya diagnosticado de manera prenatal debe realizarse un cariotipo confirmatorio posnatal, en los diagnosticados únicamente por hisopado bucal, en los individuos con un cariotipo realizado en el pasado distante, y cuando no hay un informe original disponible para revisión².

El cariotipo es un método a menudo costoso; por lo tanto, en las pacientes con un fenotipo leve o con algún signo clínico aislado, el diagnóstico del ST se retrasa y no es posible realizar un tratamiento eficaz en el momento adecuado.

Hibridación *in situ* por fluorescencia

Esta técnica, que comenzó a realizarse a fines de la década de 1980, se basa en la marcación con fluorescencia de una sonda de DNA complementaria a la región de interés, que es hibridada a extensiones cromosómicas en interfase o metafase. Existen diversos tipos de sondas específicas de acuerdo con lo que se desea encontrar: cromosómicas, regiones relevantes de cromosomas y sondas específicas de locus. El tamaño de la sonda puede variar de Kb a 1 Mb¹. Mediante la FISH, es posible detectar duplicaciones o deleciones genómicas, así como inversiones y translocaciones balanceadas.

Tiene mayor resolución que el cariotipo por su capacidad de detectar alteraciones cromosómicas de menor tamaño, inversiones o translocaciones balanceadas, y también mosaicismo para cualquiera de las alteraciones. Como desventajas, los datos de la FISH dependen totalmente de las sondas utilizadas y la tecnología requiere un trabajo técnico importante y poco automatizable¹. En general, los ensayos diagnósticos por FISH requieren que haya una sospecha clínica para seleccionar sondas de locus específico de la región por estudiar.

Micromatrices

Tanto las plataformas de hibridación genómica comparativa con micromatrices (*microarray-based comparative genomic hybridization*, aCGH), como las micromatrices que incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNP), constituyen lo que se denomina cariotipado molecular¹ y permiten diagnosticar reordenamientos en cualquier lugar del genoma. Ofrecen un mayor rendimiento diagnóstico (5 kb [5 mil pb]) en comparación con el cariotipo, por lo que se han convertido en las técnicas de elección iniciales para el estudio etiológico de cuadros de discapacidad intelectual, trastornos del espectro autista o anomalías congénitas no bien definidas clínicamente. Las micromatrices incrementan un 5-10% la tasa de detección de alteraciones cromosómicas relevantes en los embarazos de alto riesgo y un 1-2% en los embarazos de bajo riesgo¹.

Plataformas de hibridación genómica comparativa con micromatrices

Consta de una hibridación genómica comparada, al comparar el genoma en cuestión fren-

te a un genoma de referencia. Esta técnica se basa en la cohibridación del DNA por probar y el DNA de control marcados con diferentes fluorocromos a un soporte sólido que contiene fragmentos de DNA inmovilizados (sondas). La competencia de la hibridación permite detectar ganancias o pérdidas de material genético en todas las regiones del genoma cubiertas por las sondas en la muestra del paciente respecto del control. Las ventajas de esta técnica son su mayor sensibilidad y poder de resolución en comparación con las técnicas previas, la posibilidad de automatización y un menor tiempo de entrega de los resultados, ya que no se requiere cultivo celular para la obtención del DNA. Como limitaciones, no detecta alteraciones cromosómicas balanceadas y puede ser difícil identificar alteraciones que afecten todos los cromosomas (poliploidías) y mosaicismos de bajo grado (cuando la alteración está presente únicamente < 20-30% de las células)¹⁴. Es el estudio de todo el genoma, es decir, se estudian todos los cromosomas tanto para la detección de pérdida o de ganancia de material genético.

Micromatrices que incluyen polimorfismos de un solo nucleótido

Un tipo de micromatriz de gran resolución basado en oligonucleótidos es el que incluye polimorfismos de un solo nucleótido. Esta técnica permite detectar, al igual que la aCGH, ganancias y pérdidas de material genético en todo el genoma. Es más sensible para detectar reordenamientos presentes en mosaicismos. Tiene la ventaja de que permite analizar hasta varios millones de SNP en un solo ensayo.

Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular que permite la amplificación de una región específica conocida del DNA obteniendo millones de copias²⁶. Es posible detectar mutaciones puntuales, como la repetición del triplete CGG en el gen *FMRI*, característica del síndrome del cromosoma X frágil. La PCR es útil en las pacientes con sospecha de una anomalía genética 45,X/46,XY, ya que la tasa de detección del material cromosómico Y aumenta. La PCR en tiempo real con múltiples sondas específicas de Y es más sensible que la FISH y puede detectar mosaicismo en hasta el 12% de los casos de ST².

Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples

La amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (*multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) es una técnica semicuantitativa que permite el análisis de 60 secuencias de DNA diferentes en una misma reacción. Se aplica principalmente para el estudio de grandes deleciones y duplicaciones (grandes reordenamientos). Tiene como ventajas, frente a la aCGH, que posibilita la detección de regiones más pequeñas, de 50-70 nucleótidos y, frente a la FISH, que en una única reacción se pueden analizar varias regiones a la vez. Su limitación es que requiere DNA de inicio de buena calidad.

Pirosecuenciación de alto rendimiento

La secuenciación de DNA es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de DNA. La pirosecuenciación es una técnica de segunda generación desarrollada a finales de la década de 1990. Se basa en la detección de la secuencia específica del material genético, acoplado la síntesis de DNA a una reacción quimioluminiscente, lo que permite una rápida determinación de secuencias en tiempo real²⁶. Se trata de una técnica no fluorescente que mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido; producen una imagen que se analiza para proporcionar flujogramas que, una vez interpretados por la computadora, devuelven las secuencias de nucleótidos²⁷.

IMPLICACIONES DEL DIAGNÓSTICO PRECOZ

El diagnóstico precoz permite una intervención oportuna a fin de identificar diversas malformaciones, principalmente del sistema cardiovascular, para evitar las complicaciones. Además, facilita la prevención o la corrección de la estatura baja, los problemas de audición y las dificultades de aprendizaje, con la consiguiente mejora de la calidad de vida². En general, cuanto más se demora el inicio del tratamiento, mayor es el déficit de altura y menor la probabilidad de alcanzar la estatura normal del adulto, además de impedir la iniciación del tratamiento para el desarrollo puberal en el momento adecuado.

Al mismo tiempo, a pesar de ser dificultoso, se puede mejorar la posibilidad reproductiva en algunas personas con ST al permitir la criopreservación temprana de ovocitos o de tejido ovárico².

CONCLUSIONES

Gracias al avance tecnológico de los distintos métodos diagnósticos, es posible arribar a un diagnóstico precoz e iniciar el tratamiento de forma temprana, lo que disminuye las complicaciones propias de la enfermedad (enfermedad cardiovascular, alteraciones esqueléticas, desarrollo puberal) y mejora la calidad de vida de estas pacientes.

REFERENCIAS

- Palacios-Verdú MG, Pérez-Jurado LA. Nuevas metodologías en el estudio de enfermedades genéticas y sus indicaciones. *Pediatr Integral* 2014;18(8):515-28.
- Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 2017;177:3G1-G70.
- Ríos Orbañanos I, et al. Síndrome de Turner: del nacimiento a la edad adulta. *Endocrinol Nutr* 2015.
- Alpera Lacruz R, Borrás Pérez MV, López Siguero JP, et al. Síndrome de Turner. Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica; 2004.
- De la Parra I, et al. Endocrinología Ginecológica: una visión latinoamericana en el siglo XXI. ALEG, 1.ª ed. Buenos Aires: Journal; 2013.
- Buczerzan S, Miclea D, Popp R, et al. Clinical and genetic characteristics in a group of 45 patients with Turner syndrome (monocentric study). *Ther Clin Risk Manag* 2017;13:613-22.
- Wolff DJ, Van Dyke DL, Powell CM; A Working Group of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Laboratory guideline for Turner syndrome. *Genet Med* 2010;12(11):52-5.
- Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 2017;177:G1.
- Del Rey G. El gen SHOX y el crecimiento corporal: descripción, estructura y nuevas técnicas de diagnóstico. *J Basic Appl Genet* 2010;21(2).
- Venegas P, Sánchez MA. Anormalidades estructurales del cromosoma X y su relación clínica. *Rev Med Hosp Nac Niños (Costa Rica)* [Internet]. 1998;33(1-2):19-23.
- Villanueva-Ortega E, Ahedo B, Fonseca-Sánchez MA, et al. Analysis of PTPN22, ZFAT and MYO9B polymorphisms in Turner syndrome and risk of autoimmune disease. *Int J Immunogenet* 2017;1-5.
- Bondy C, Bakalov VK, Cheng C, et al. Bicuspid aortic valve and aortic coarctation are linked to deletion of the X chromosome short arm in Turner syndrome. *J Med Genet* 2013;50:662.
- Loscalzo ML, Van PL, Ho VB, et al. Association between fetal lymphedema and congenital cardiovascular defects in Turner syndrome. *Pediatrics* 2005;115:732.
- Ramos Fuente FJ, Ribate Molina MP. Diagnóstico genético preimplantacional. *Rev Esp Pediatr* 2007;63(6):443-99.
- Carreras E, Fortuny A, González de Agüero R, et al. Grupo de Trabajo de la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas *Diagn Prenat* 2013;24(2):57-72.
- Groisman B, Duarte S, Gili J, et al. Reporte Anual RENAC 2016: Análisis epidemiológico sobre las anomalías congénitas en recién nacidos, registradas durante 2015 en la República Argentina. Ministerio de Salud. Agosto 2016.
- Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012;20:521-6.
- Polipalli SK, Karra VK, Jindal A, et al. Cytogenetic analysis for suspected chromosomal abnormalities; a five years experience. *J Clin Diagn Res* 2016;10(9):GC01-GC05.
- Jodi S. Dashe Series de Especialidad Clínica: Detección de aneuploidías en el embarazo. *Obstet Gynecol* 2016;128:181-94.
- Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar R, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45:249-66.
- Parra-Saavedra M, Cruz-Lemini M, Borobio V, et al. Revisión Amniocentesis: Guía Práctica de Diagnóstico Prenatal 2014;25(1):20-7.
- Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology. Management of women with premature ovarian insufficiency. POI Guideline Development Group. December 2015.
- Xue Jiao, Huihui Zhang, Hanni Ke, et al. Premature ovarian insufficiency: phenotypic characterization within different etiologies. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102(7):2281-90.
- Baber RJ, Panay N, Fenton A, and the IMS Writing Group. 2016 IMS Recommendations on women's midlife health and menopause hormone therapy. *Climacteric* 2016;19(2):109-50.
- Azcona C, Bareille P, Stanhope R. Lesson of the week: Turner's syndrome mosaicism in patients with a normal blood lymphocyte karyotype. *BMJ* 1999;318:856.
- Paz-y-Miño C, López-Cortés A. Genética Molecular y Citogenética Humana: Fundamentos, aplicaciones e investigaciones en el Ecuador. Universidad de las Américas, Universidad Yachay, Quito, Ecuador, 2014.
- Bautista Moreno R. Las tres generaciones de la secuenciación. Plataforma Andaluza de Bioinformática, Universidad de Málaga. Marzo-mayo 2010.

Células madre amnióticas epiteliales humanas: diferenciación hepática y propiedades regenerativas

Human amniotic membrane stem cells: hepatic differentiation and regenerative properties

Rodrigo Riedel, Cecilia L. Varone y Julieta L. Maymó

Instituto de Química Biológica (IQUIBICEN), CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Contacto de la autora: Julieta Maymó

E-mail: julietamaymo@gmail.com

Correspondencia: Departamento de Química Biológica, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, piso 4 (1428), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 30/7/2018

Aceptado: 15/8/2018

Conflicto de interés: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Resumen

La placenta y los anexos extraembrionarios representan una atractiva fuente de células para utilizar en la medicina regenerativa. En particular, la membrana amniótica tiene células con características de células madre, que han llamado la atención particular de médicos e investigadores del área. Las células amnióticas epiteliales humanas (hAEC) tienen características únicas y deseadas que las colocan por encima de otras células madre, no solo por el potencial de proveer células de manera ilimitada, por el fácil acceso a los tejidos y por las mínimas barreras éticas y legales asociadas con su obtención, sino también por expresar marcadores embrionarios de células madre y por tener la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales. Asimismo, no son carcinógenas y tienen propiedades inmunosupresoras, lo que permitiría su trasplante alogénico. La falla hepática es una de las mayores causas de morbilidad en el mundo y pese a que el trasplante hepático es la mejor forma de tratar la falla hepática aguda y crónica, hay varios obstáculos para ello. Las células madre han sido señaladas como una fuente alternativa de hepatocitos por su potencial de diferenciación en este tipo celular. En particular, las hAEC tienen ciertas propiedades que las vuelven atractivas para la obtención de hepatocitos a través de distintos protocolos de diferenciación específicos. En este trabajo, se revisan las características generales de las células madre aisladas del amnios de la placenta humana, así como su capacidad para diferenciarse en células hepáticas y también sus propiedades regenerativas.

Palabras clave: Amnios, células amnióticas epiteliales, células madre, pluripotencia, placenta, diferenciación hepática.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV N° 2 Diciembre de 2018: 70-77

Abstract

The placenta and the extraembryonic tissues represent an attractive source of cells for regenerative medicine. In particular, the amniotic membrane possess cells with stem cells characteristics that have called researchers special attention. The human amniotic epithelial cells (hAECs) have unique and desirable characteristics that position them over other stem cells, not only for the unlimited potential supplied of, the easy access to tissues and the minimal ethical and legal barriers associated, but also for expressing embryo stem cells markers and for their ability to differentiate to three germ layers. In addition, the hAECs are not tumorigenic and have immunomodulatory properties, what would allow allogeneic transplants. Hepatic failure is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide, and even though hepatic transplantation is the best way to treat acute and chronic liver failure, there are several obstacles related. Stem cells have been highlighted as alternative hepatocytes source because their potential to differentiate to this cell type. The hAECs in particular, have some properties that make them attractive for hepatocyte differentiation, through specific protocols. In this work, we will review the general characteristics of the stem cells isolated from human amnion, as well as their capacity to differentiate in liver cells, and their regenerative properties.

Key words: Amnion, human amniotic epithelial cells, stem cells, pluripotency, placenta, hepatic differentiation.

Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva 2018; Vol. XXV N° 2 Diciembre de 2018: 70-77

INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes desafíos de la medicina regenerativa es hallar una fuente segura y efectiva de células madre que pueda emplearse en el tratamiento de distintas enfermedades. Las células madre embrionarias y adultas tienen potencial terapéutico para la corrección de enfermedades estructurales, congénitas o adquiridas. Sin embargo, existen limitaciones en el uso de estas células

en la clínica, referidas principalmente a consideraciones legales o éticas y a dificultades en su obtención, o a su carcinogenicidad. En los últimos años, se ha prestado especial atención a los tipos celulares aislados de la placenta¹. Esta es reconocida como una fuente abundante de células multipotentes y pluripotentes. Los tejidos gestacionales ofrecen considerables ventajas en relación con otros tejidos de los que se pueden aislar

células madre: el potencial ilimitado de proveer células, el fácil acceso a esos tejidos, las mínimas barreras éticas y legales asociadas con su uso, la obtención sin necesidad de procedimientos invasivos y, lo más importante, no son carcinógenas. La placenta, además, contiene células con propiedades inmunomoduladoras. Las membranas fetales están compuestas por el amnios, el corion y la decidua capsular². El amnios es un tejido de origen fetal formado por una capa epitelial de células que reposan sobre una membrana basal colagenosa, seguida de una capa compacta acelular llena de fibras reticulares, una capa de fibroblastos y una capa esponjosa altamente higroscópica con fibras, entre el corion y el saco amniótico³. Dos tipos de células madre pueden aislarse de la membrana amniótica humana: las células mesenquimáticas estromales (hAMSC), distribuidas en el estroma colagenoso, que yacen bajo el epitelio amniótico, del que se aíslan las células amnióticas epiteliales (hAEC). Las hAEC delimitan el interior de la placa coriónica, en contacto con el líquido amniótico. Derivan del epiblasto pluripotente, que da origen a las tres capas germinales del embrión: endodermo, mesodermo y ectodermo⁴, expresan marcadores normalmente presentes en las células embrionarias o germinales y presentan varias características que las hacen atractivas para la terapia celular^{5,6}. Las hAEC, además de ser pluripotentes, tienen baja inmunogenicidad y propiedades antiinflamatorias, su aislamiento es sencillo, su origen no plantea dilemas éticos y se obtienen en gran cantidad⁷⁻¹¹. Las células amnióticas no expresan telomerasa, no son carcinógenas luego de su trasplante⁶, y expresan marcadores embrionarios de membrana, como SSEA-3 y SSEA-4¹². Asimismo, expresan marcadores de células madre pluripotentes, como OCT-4, NANOG y SOX-2, entre otros^{6,13}.

Las células amnióticas epiteliales humanas tienen múltiples aplicaciones y potenciales de diferenciación

Las propiedades de las hAEC han sido reconocidas desde hace muchos años. La membrana amniótica se utiliza en tratamientos de diferentes enfermedades oculares, en la reconstrucción de tejidos dañados y en trasplantes de piel¹⁴. Además, la variedad de esas propiedades, como promover la reepitelización, disminuir la inflamación y la fibrosis, e inhibir la angiogénesis, vuelve a la membrana amniótica de gran utilidad para distin-

tas aplicaciones clínicas¹⁵. Es posible crear un amnios artificial empleando hAEC en una matriz de colágeno que contenga fibroblastos estromales amnióticos humanos. Se ha demostrado también que el amnios promueve la curación y regeneración en modelos de enfermedad en animales¹⁶.

Las hAEC redujeron la fibrosis pulmonar y mejoraron la función cuando se trasplantaron en modelos murinos y de oveja de daño pulmonar; se diferencian en células epiteliales alveolares productoras de factor surfactante en el pulmón^{17,18}. Se ha demostrado que pueden diferenciarse en neuronas funcionales y células de la glía en varios modelos de enfermedades neurológicas. Son capaces de producir catecolaminas *in vitro* y su trasplante en un modelo de enfermedad de Parkinson condujo a la producción de dopamina *in vivo*. En este sentido, en modelos de lesión del cordón espinal en animales, llevaron a resultados beneficiosos sin inflamación ni rechazo. En monos con el cordón espinal cortado, las hAEC ejercieron efectos reparadores y regeneradores y evitaron la muerte de las neuronas axotomizadas después de 60 días de la inyección¹⁹⁻²¹. También repararon el daño de neuronas colinérgicas, dado que pueden expresar colinacetyltransferasa y acetilcolina²². Al ser trasplantadas en ratones con oclusión arterial severa, fueron capaces de colonizar el sitio de isquemia y de reducir el área afectada. Empleando protocolos de diferenciación específicos, las hAEC se diferencian en células beta pancreáticas secretoras de insulina, que normalizan la glucosa en la sangre en ratones diabéticos²³. Fujimoto et al.²⁴ demostraron el potencial del trasplante singéneo de células amnióticas en modelos de infarto de miocardio en ratas. Las células trasplantadas se encontraron en el tejido cardíaco en todos los tiempos estudiados; se observó una reducción del daño del miocardio y se previno el afinamiento miocárdico. Numerosos laboratorios informaron también la diferenciación osteogénica⁸, condrogénica²⁵, adipogénica⁸ y hepática²⁶⁻²⁹ de las hAEC. Esta última ha suscitado particular interés, dada la relativa facilidad de esas células para diferenciarse en hepatocitos maduros y funcionales, así como para colonizar el tejido dañado en los ensayos *in vitro*.

Otra aplicación importante en la que se están empleando células madre es en el desarrollo y las pruebas de fármacos. Las células derivadas del amnios son candidatas ideales para estos

ensayos *in vitro*. El éxito de las hAEC para diferenciarse en hepatocitos o en cardiomiocitos maduros podría ser clave. Los modelos preclínicos para estudiar la cardiotoxicidad son difíciles por la falta de modelos celulares adecuados y los cultivos primarios de cardiomiocitos sanos no están fácilmente disponibles. Al tener el potencial de diferenciarse en cardiomiocitos, son células valiosas en este campo. Asimismo, se diferencian en hepatocitos y expresan genes hepáticos y enzimas metabolizantes, incluido el citocromo P-450¹⁷. Una vez que las condiciones de cultivo se encuentren optimizadas para producir cardiomiocitos o hepatocitos maduros a partir de las hAEC, habrá una fuente inagotable de células para estudiar el metabolismo de los fármacos y para fines toxicológicos.

Por estas razones, el amnios representa una fuente promisoría de células para utilizar en la clínica.

Enfermedades hepáticas y células madre

Las enfermedades hepáticas afectan a millones de personas en el mundo. La única curación actual para el tratamiento de las enfermedades hepáticas terminales causadas por exposición crónica a virus, consumo excesivo de alcohol, enfermedades metabólicas y falla aguda es el trasplante ortotópico. Sin embargo, dada la escasez de donantes de órganos a corto plazo y la necesidad de inmunosupresión luego del trasplante, las terapias alternativas están siendo intensamente investigadas. El rápido incremento del conocimiento acerca de la biología de las células madre y de los procesos intrínsecos de reparación hepática ha abierto nuevas oportunidades para el uso de células madre en una plataforma de terapias regenerativas en enfermedades hepáticas³⁰. Se han investigado numerosos tipos de células como fuentes para la regeneración hepática, incluidos hepatocitos adultos y fetales, poblaciones de células madre intrahepáticas, células madre hematopoyéticas derivadas de médula ósea adulta, progenitores endoteliales, células mesenquimáticas estromales, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas y células madre placentarias. Todas estas células, muy diferentes entre sí, utilizadas ya sea en suspensión o en combinación con biomateriales como construcciones de tejido hepático implantable, han originado una gran expectativa sobre la regeneración hepática.

La población de células madre bipotentes intrahepáticas actúa cuando se interrumpe la proliferación, es deficiente o existe una lesión hepática. Frente a estas situaciones, las células madre emergen, se activan y comienzan el proceso regenerativo. La identificación precisa de las células madre endógenas y de los mecanismos que gobiernan su proliferación y diferenciación en hepatocitos maduros podría facilitar su maduración *in vitro* e *in vivo* y hacerlas aplicables en la clínica. Las células madre fetales hepáticas aparecen durante la embriogénesis, luego del establecimiento del endodermo hepático. Su capacidad para expandirse clonógicamente *in vitro*, su pluripotencia, y la evidencia de que dan origen a hepatocitos maduros impulsan su utilidad clínica en el trasplante y la generación de hígados artificiales. Sin embargo, los dilemas éticos y la probabilidad de que formen teratomas o carcinomas en el receptor justifican su uso solo para estudios preclínicos³¹. Varios tipos celulares distintos de los endógenos del hígado han demostrado potencial para contribuir al proceso de curación del hígado dañado. Las células madre embrionarias son capaces de diferenciarse en células similares a los hepatocitos *in vitro*, produciendo células que tienen algunas propiedades de los hepatocitos maduros³². Los hepatocitos derivados de hAEC presentan la típica morfología hepática y expresan genes específicos hepáticos, colonizan el hígado luego de su trasplante en ratones y los rescatan de su muerte por daño hepático. Las hAEC proveen una herramienta valiosa para estudiar las bases moleculares de la diferenciación hepática; sin embargo, pese a los avances y la sofisticación de los protocolos existentes, los hepatocitos derivados de las hAEC suelen fallar en su función hepática y hay un riesgo alto de carcinogenicidad y de rechazo inmunitario, sumados a los dilemas éticos y legales asociados a su utilización³³. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) pueden ser eficientemente conducidas a diferenciarse en hepatocitos. Su trasplante revirtió fallas hepáticas fulminantes en modelos murinos, aumentó la regeneración y mejoró la función. Las iPSC han renovado la esperanza de la medicina regenerativa porque podrían emplearse para terapias personalizadas, y su obtención evita los problemas éticos y legales y el rechazo inmunitario. No obstante, hay ciertos puntos que aún necesitan ser resueltos, antes de pasar esta tecnología a la clínica, como la posibilidad de reprogramación incompleta; la formación de teratomas; el costo de las diferenciaciones; o la

seguridad, tolerancia y eficacia a largo plazo³⁴. Las células madre multipotentes de la médula ósea dan origen a células del linaje hematopoyético, pese a que hay informes que demuestran que pueden generar otros tipos de células diferenciadas adultas que contribuyen al proceso de reparación del hígado luego de una lesión³⁵. De todas formas, tanto en estudios clínicos como preclínicos, en ausencia de presión selectiva, la verdadera contribución de las células madre de la médula ósea es extremadamente baja para sustentar efectivamente la recuperación hepática.

Las células madre placentarias no solo expresan características de las células hepáticas humanas, sino que también han demostrado cumplir varias funciones típicas de los hepatocitos^{36,37}. Las células madre mesenquimáticas de la placenta se encuentran en la placenta vellosa y en otros anexos, incluso en la membrana amniótica. Además de las AMSC y las AEC pueden aislarse células mesenquimáticas del corion (CMSC), del líquido amniótico (AF-MSC), del cordón umbilical (UCB-MS) y de la gelatina de Wharton. Las células mesenquimáticas de la placenta expresan los típicos marcadores CD73, CD90 y CD105. Algunas de las poblaciones de las células madre mesenquimáticas expresan genes presentes en los progenitores hepáticos, lo que sugiere que podrían diferenciarse en líneas hepáticas con un protocolo adecuado. Las MSC de la membrana amniótica, del líquido amniótico y de la gelatina de Wharton expresan albúmina, alfafetoproteína y citoqueratina-18. Las AMSC y las AEC también expresan el factor nuclear hepático-4 α (HNF-4 α), un factor de transcripción clave, presente en los progenitores hepáticos y en las células maduras³⁸. Si bien las células madre mesenquimáticas de la placenta son capaces de diferenciarse en células similares a las hepáticas *in vitro*, solo pocos estudios han investigado la capacidad para su diferenciación *in vivo*, o si la célula diferenciada puede ser trasplantada y mejorar la función hepática. Las UCB-MS han sido probadas en un modelo de falla hepática fulminante y se informó que la función del hígado mejoró significativamente. Las células trasplantadas fueron positivas para la alfafetoproteína y para la albúmina luego de un mes, lo que indica que las células trasplantadas se diferenciaron en una mezcla de hepatocitos maduros e inmaduros, si bien el porcentaje de colonización fue bajo (menor del 1%)³⁹. La diferenciación *in vivo* de las AM-MS en modelos murinos de fibrosis también se observó,

pero solo un pequeño número de las células inyectadas se vieron en el hígado⁴⁰. Casos similares se registraron en las células mesenquimáticas de la gelatina de Wharton, pero las células trasplantadas permanecieron indiferenciadas. Los estudios demuestran que las MSC de la placenta son promisorias para su diferenciación en hepatocitos y posterior trasplante; sin embargo, aún no presentan el suficiente potencial para suplir las funciones y el tejido de un hígado dañado y ser trasladadas a la clínica.

En este contexto, las células madre amnióticas epiteliales emergen como una fuente alternativa promisorias de hepatocitos. El trasplante de hAEC al hígado tiene propiedades terapéuticas deseadas, incluida la secreción de metaloproteasas que promueven fibrinólisis y un incremento en la concentración de IL-10. En un modelo de enfermedad hepática, el trasplante de hAEC dio lugar a la colonización hepática y a la disminución de la inflamación, la fibrosis y la apoptosis⁴⁰. Lin et al.⁴¹ demostraron que la diferenciación de hAEC en células similares a las hepáticas (CSH) puede permanecer viable y funcional luego de encapsularlas en microesferas de alginato, y que expresan CYP3A4, citocromo clave en la función hepática.

Las células amnióticas epiteliales humanas como células promisorias en la curación alternativa de enfermedades hepáticas

En condiciones específicas de cultivo, las células amnióticas epiteliales pueden adquirir características hepáticas específicas. Una gran variedad de trabajos han investigado la diferenciación hepática de las hAEC empleando protocolos que varían desde un simple paso con factores de crecimiento e inductores hepáticos hasta una exposición secuencial de múltiples pasos con los mismos fármacos. El objetivo general es obtener una rápida proliferación celular seguida de la inducción de los progenitores hepáticos y, finalmente, la maduración y el mantenimiento de los hepatocitos. Algunos estudios informaron que las hAEC recién aisladas expresan cierta diferenciación hepática primitiva en cultivo^{29,42}. Los trabajos previos sugirieron que la membrana amniótica o las células epiteliales aisladas de ella pueden ser trasplantadas de manera segura a animales o a pacientes y que pueden ser útiles en el tratamiento de las enfermedades hepáticas⁴³⁻⁴⁶. Así, basándose en su escasa inmunogenicidad, la

no carcinogenicidad y su diferenciación hepática relativamente sencilla, diversos estudios se han dedicado a buscar nuevos protocolos u optimizar los existentes de manera de obtener hepatocitos maduros a partir de hAEC indiferenciadas^{15,27,29,41,42,47}. Para utilizarlas en la clínica de la manera más eficiente posible, debería hallarse el momento óptimo durante su diferenciación para el trasplante. En este contexto, hacen falta estudios acerca de los procesos celulares y moleculares que ocurren durante la diferenciación hepática de las células madre amnióticas. Pese a las ventajas relacionadas con el uso de las hAEC como células madre, ciertas limitaciones permanecen sin resolver, dado que se requiere un gran número de células para su aplicación en trasplantes e ingeniería de tejidos. La cantidad de células que se obtiene por amnios es, en promedio, de 50 a 100 millones⁶; sin embargo, las terapias celulares requerirían varios miles de millones de cada línea diferenciada para tratamientos de múltiples dosis y, fundamentalmente, para prevenir los microquimerismos y las respuestas inmunitarias potenciales que surgirían por haber obtenido las células de múltiples donantes.

Sakuragawa et al.²⁶ informaron que las hAEC en cultivo expresan albúmina y alfafetoproteína *in vitro* e *in vivo*. Se ha empleado un protocolo de varios pasos para inducir la maduración hepática de las hAEC y se han obtenido CSH que expresan marcadores hepáticos de fase tardía, incluidos genes del citocromo P-450, esenciales para el metabolismo de fármacos en hepatocitos funcionales²⁹. Otro estudio trasplantó hAEC en modelos murinos de cirrosis inducida y demostró el efecto antifibrótico de estas células⁴⁵. Estos autores demostraron la expresión de albúmina humana en el suero de ratón que debía ser secretada por las células hepáticas derivadas de las hAEC. Por otro lado, Maymó et al., empleando un protocolo simple de diferenciación en dos pasos, con factor de crecimiento epidérmico (EGF), dexametasona y un medio rico de formulación específica, obtuvieron CSH, que expresaron marcadores de hepatocitos maduros y funcionales, como CYP3A4, albúmina y CYP7A1⁴⁸. Este trabajo demuestra, además, que el medio de diferenciación empleado induce proliferación celular aumentando el número y mejorando la calidad de las CSH obtenidas. Existen estudios que reportan la inducción de marcadores hepáticos tempranos con la adición del factor de crecimiento hepático (HGF), FGF-2, heparina de sodio y oncostatina-M²⁷. Marongiu et al. demost

ron la diferenciación hepática con un protocolo sencillo de cocultivo de hepatocitos murinos con hAEC, induciendo la maduración hepática de estas⁴². Se observó que luego del trasplante de la membrana amniótica en el peritoneo de ratones con daño hepático puede detectarse albúmina humana en el suero²⁷. Asimismo, se ha demostrado que el trasplante de hAEC en ratones inmunodeficientes deriva en la detección de α_1 -antitripsina circulante, lo que confirma que estas células pueden desarrollar una función hepática *in vivo*. En animales con cirrosis hepática tratados con hAEC, se hallaron células positivas para citoqueratinas en los conductos biliares y algunos de ellos parecían estar totalmente humanizados⁵.

El gran número de trabajos que investigan la diferenciación y la capacidad regenerativa hepática de las células amnióticas muestran el potencial prometedor de esas células en esta área de la medicina regenerativa.

Aplicaciones clínicas y perspectivas

El potencial de diferenciación hepática de las hAEC sugiere su utilidad en el campo de las terapias celulares frente a trastornos metabólicos congénitos del hígado. Aproximadamente uno de cada 1.500 niños nacen con un trastorno metabólico y muchos de estos errores en los procesos sintéticos o metabólicos involucran el hígado. Los datos sugieren que un reemplazo celular del 5% por hepatocitos sanos sería suficiente para mejorar la vida de los pacientes. Las células sanas deberían expresar únicamente la enzima dañada, sin necesidad de una diferenciación hepática completa. Las hAEC derivadas de hepatocitos son una fuente atractiva para este reemplazo. Uno de los estudios preclínicos comprobó que los animales con enfermedad metabólica inducida inyectados con hAEC diferenciadas presentaron una supervivencia del 80%⁴⁹.

La mayoría de las enfermedades hepáticas están causadas por diversas agresiones al hígado que progresan desde la inflamación (hepatitis) hasta la fibrosis. El mecanismo patogénico de inflamación y fibrosis puede ser solucionado con las propiedades inmunomoduladoras de las hAEC. Estas células son capaces de atenuar la respuesta linfocítica y su medio condicionado puede suprimir la activación de las células estelares hepáticas⁵⁰.

En varios modelos de cirrosis hepática se comprobó la eficacia terapéutica de las hAEC. El grupo de Parolini logró modular la gravedad y progresión

de la fibrosis aplicando un parche de membrana amniótica en la superficie de un hígado de rata dañado⁵¹. Otro estudio demostró que el trasplante sistémico de hAEC en ratones con fibrosis hepática mejoró significativamente la función, y disminuyó la activación de células hepáticas estelares y la producción de quimiocinas proinflamatorias⁴⁵.

En 2017 se inició el primer ensayo clínico en fase I con hAEC alogénicas en pacientes con cirrosis hepática. Las células se inyectaron por vía intravenosa, con distintos esquemas, en 12 pacientes voluntarios⁵². Este estudio producirá novedosos resultados y expectativas para el uso futuro de las células amnióticas en la clínica.

CONCLUSIONES

Existe una necesidad terapéutica de hallar estrategias celulares para tratar las enfermedades hepáticas, en las que han ido creciendo las diferencias entre la demanda y la disponibilidad de donantes. Las terapias que utilizan hepatocitos están disponibles en la clínica, pero aún deben resolverse algunos problemas, como la seguridad a largo plazo, la tolerabilidad y la eficacia del tratamiento. Así, el reto actual incluye el desarrollo de procesos fiables y eficientes de diferenciación, evadiendo problemas de carcinogenicidad y con producción de células en gran escala. Las células madre amnióticas epiteliales tienen cuatro características únicas que las hace especiales para la medicina regenerativa y de trasplantes: sus propiedades inmunomoduladoras, su capacidad para diferenciarse en las tres capas germinales, su origen sin cuestionamientos éticos y su falta de carcinogenicidad. Estas propiedades convierten a este tipo celular en un importante candidato para ser empleado como fuente alternativa de células en pacientes que requieren un trasplante de hepatocitos. No obstante, antes de su uso en la clínica, deben definirse no solo la dosis adecuada, sino también los distintos momentos para el trasplante bajo evaluaciones estrictas.

Las enfermedades hepáticas representan un problema grave de salud mundial y los tratamientos actuales no son suficientemente efectivos para solucionar la mortalidad asociada. Los variados protocolos de diferenciación desarrollados por distintos grupos han demostrado que las hAEC pueden diferenciarse con éxito en hepatocitos maduros y funcionales. Más aún, cuando se las empleó en estudios preclínicos con modelos de enfermedad hepática en animales, mostraron tener un alto potencial regenerativo. Dada la gran cantidad de requerimientos

para que una célula madre sea clínicamente aplicable, se necesitan más estudios que aseguren la identidad de los marcadores de superficie de las células trasplantadas, así como las condiciones de cultivo que permitan la expansión celular sin alterar las características. Se debe continuar acumulando evidencia científica para utilizar de manera segura el potencial terapéutico de las hAEC. Son necesarios más estudios que incluyan una evaluación integral del proceso de diferenciación de estas células, de manera de establecer el momento óptimo, en cuanto a calidad y cantidad, para su trasplante.

Las hAEC son extremadamente seguras y han demostrado eficiencia terapéutica en modelos de enfermedades en general, y de patologías hepáticas en particular, en animales. Así, una vez establecido un mecanismo de tratamiento, las aplicaciones clínicas de estas células para los pacientes con enfermedades hepáticas se encontrarán en un futuro más cercano.

REFERENCIAS

1. Antoniadou E, David AL. Placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015;31:13-29.
2. Si JW, Wang XD, Shen SG. Perinatal stem cells: A promising cell resource for tissue engineering of craniofacial bone. *World J Stem Cells* 2015;7(1):149-59.
3. Antoniadou E, David AL. Placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015.
4. Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009;30(1):2-10.
5. Miki T, Strom SC. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006;2(2):133-42.
6. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005;23(10):1549-59.
7. Banas RA, Trumppower C, Bentelejewski C, Marshall V, Sing G, Zeevi A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. *Hum Immunol* 2008;69(6):321-8.
8. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007;77(3):577-88.
9. Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni PB, Sanzone S, Lombardi G, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation* 2004;78(10):1439-48.
10. Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 2006;25(10 Suppl 1):S53-8.
11. Insausti CL, Blanquer M, Garcia-Hernandez AM, Castellanos G, Moraleta JM. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning* 2014;7:53-63.
12. Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA,

- Moore H, et al. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 2002;20(4):329-37.
13. Simat SF, Chua KH, Abdul Rahman H, Tan AE, Tan GC. The stemness gene expression of cultured human amniotic epithelial cells in serial passages. *Med J Malaysia* 2008;63 Suppl A:53-4.
 14. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci* 2007;105(3):215-28.
 15. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhning HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2008;26(2):300-11.
 16. Mi S, David AL, Chowdhury B, Jones RR, Hamley IW, Squires AM, et al. Tissue engineering a fetal membrane. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(3-4):373-81.
 17. Moodley Y, Ilancheran S, Samuel C, Vaghjiani V, Atienza D, Williams ED, et al. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(5):643-51.
 18. Carbone A, Paracchini V, Castellani S, Di Gioia S, Seia M, Colombo C, et al. Human amnion-derived cells: prospects for the treatment of lung diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013.
 19. Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res* 2004;78(2):208-14.
 20. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000;165(1):27-34.
 21. Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003;118(1):11-7.
 22. Sakuragawa N, Misawa H, Ohsugi K, Kakishita K, Ishii T, Thangavel R, et al. Evidence for active acetylcholine metabolism in human amniotic epithelial cells: applicable to intracerebral allografting for neurologic disease. *Neurosci Lett* 1997;232(1):53-6.
 23. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003;12(5):545-52.
 24. Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, Hashizume R, Strom SC, Wagner WR, et al. Naive rat amnion-derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of post-infarcted heart. *Cell Transplant* 2009;18(4):477-86.
 25. Zhou J, Yu G, Cao C, Pang J, Chen X. Bone morphogenetic protein-7 promotes chondrogenesis in human amniotic epithelial cells. *Int Orthop* 2011;35(6):941-8.
 26. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 2000;45(3):171-6.
 27. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct* 2004;29(3):73-84.
 28. Strom SC, Bruzzone P, Cai H, Ellis E, Lehmann T, Mitamura K, et al. Hepatocyte transplantation: clinical experience and potential for future use. *Cell Transplant* 2006;15 Suppl 1:S105-10.
 29. Miki T, Marongiu F, Ellis EC, Dorko K, Mitamura K, Ranade A, et al. Production of hepatocyte-like cells from human amnion. *Methods Mol Biol* 2009;481:155-68.
 30. Locke J. Stem Cell and the liver: clinical application in transplantation. *Adv Surg* 2009;43:33-55.
 31. Dan YY, Yeoh GC. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23(5):687-98.
 32. Brolen G, Sivertsson L, Bjorquist P, Eriksson G, Ek M, Semb H, et al. Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 2010;145(3):284-94.
 33. Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003;37(5):983-93.
 34. Chen YF, Tseng CY, Wang HW, Kuo HC, Yang VW, Lee OK. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology* 2012;55(4):1193-203.
 35. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6(11):1229-34.
 36. Huang HI. Isolation of human placenta-derived multipotent cells and in vitro differentiation into hepatocyte-like cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2007;1(1E).
 37. Chien CC, Yen BL, Lee FK, Lai TH, Chen YC, Chan SH, et al. In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cells* 2006;24(7):1759-68.
 38. Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Hum Cell* 2007;20(3):77-84.
 39. Yu J, Cao H, Yang J, Pan Q, Ma J, Li J, et al. In vivo hepatic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood after transplantation into mice with liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;422(4):539-45.
 40. Zhang D, Jiang M, Miao D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS One* 2011;6(2):e16789.
 41. Lin JS, Zhou L, Sagayaraj A, Jumat NH, Choolani M, Chan JK, et al. Hepatic differentiation of human amniotic epithelial cells and in vivo therapeutic effect on animal model of cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30(11):1673-82.
 42. Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, Miki T, Ranade AR, Paola Serra M, et al. Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology* 2011;53(5):1719-29.
 43. Scaggiante B, Pineschi A, Sustersich M, Andolina M, Agosti E, Romeo D. Successful therapy of Niemann-Pick disease by implantation of human amniotic membrane. *Transplantation* 1987;44(1):59-61.
 44. Sakuragawa N, Yoshikawa H, Sasaki M. Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. *Brain Dev* 1992;14(1):7-11.
 45. Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, et al. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl(4)-treated mice. *Cell Transplant* 2010;19(9):1157-68.

46. Takahashi N, Enosawa S, Mitani T, Lu H, Suzuki S, Amemiya H, et al. Transplantation of amniotic epithelial cells into fetal rat liver by in utero manipulation. *Cell Transplant* 2002;11(5):443-9.
47. Parolini O, Alviano F, Bergwerf I, Boraschi D, De Bari C, De Waele P, et al. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. *Stem Cells Dev* 2010;19(2):143-54.
48. Maymó JL, Riedel R, Pérez-Pérez A, Magatti M, Maskin B, Duenas JL, et al. Proliferation and survival of human amniotic epithelial cells during their hepatic differentiation. *PLoS One* 2018;13(1):e0191489.
49. Skvorak KJ, Dorko K, Marongiu F, Tahan V, Hansel MC, Gramignoli R, et al. Improved amino acid, bioenergetic metabolic and neurotransmitter profiles following human amnion epithelial cell transplant in intermediate maple syrup urine disease mice. *Mol Genet Metab* 2013;109(2):132-8.
50. Hodge A, Lourensz D, Vaghjiani V, Nguyen H, Tchongue J, Wang B, et al. Soluble factors derived from human amniotic epithelial cells suppress collagen production in human hepatic stellate cells. *Cytotherapy* 2014;16(8):1132-44.
51. Sant'Anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplant* 2011;20(3):441-53.
52. Lim R, Hodge A, Moore G, Wallace EM, Sievert W. A Pilot Study Evaluating the Safety of Intravenously Administered Human Amnion Epithelial Cells for the Treatment of Hepatic Fibrosis. *Front Pharmacol* 2017;8:549.

ANÁLISIS CRÍTICO

El endometrio humano como sensor de calidad embrionaria

The human endometrium as a sensor of embryo quality

Nick S. Macklon y Jan J. Brosens

Biology of Reproduction 2014; 91:98, 1-8

Resumen

La reproducción humana se caracteriza por un alto grado de pérdida de embriones, atribuible en gran parte a una alta prevalencia de aneuploidía embrionaria. Se propone que ciertas estrategias maternas hayan evolucionado para evitar la implantación de embriones poco viables. La clave de esto es el concepto emergente del endometrio como biosensor, identificado por primera vez en sistemas de cocultivo humano *in vitro* de células de endometrio decidual/embrionario y confirmado recientemente en modelos de ratón *in vivo*. En esta revisión, se esbozan las crecientes evidencias del endometrio como biosensor y los conocimientos recientes sobre las señales embrionarias que el endometrio detecta y los procesos biológicos mediante los cuales se cree que esta señal se convierte en una respuesta endometrial favorable o desfavorable. Finalmente, se abordan las implicaciones clínicas de este nuevo paradigma del útero exigente.

Comentario

Dr. A. Gustavo Martínez

Este trabajo plantea una nueva e interesante perspectiva en el abordaje de la implantación embrionaria, colocando al endometrio como el encargado de

evaluar la calidad embrionaria y de permitir o no una implantación exitosa. Esto abre un nuevo campo de estudio y desarrollo en el tema sobre todo para aquellos que trabajamos en medicina reproductiva.

Hasta el momento en el campo de la fecundación *in vitro* hemos logrado avanzar en muchos aspectos llegando a un límite difícil de superar. Entre los logros más destacados podemos enumerar la mejora en la estimulación ovárica, en los medios de cultivo, en los sistemas de cultivo, en la transferencia embrionaria y en la criopreservación.

Se ha logrado el desarrollo de mejores protocolos de estimulación ovárica empleando nuevas estrategias adaptadas a los diferentes tipos de pacientes (bajas, normo y alta respondedoras). Empleando, además, hormonas de mejor calidad ya sea por su alto grado de purificación o directamente por ser de origen recombinante.

Los medios de cultivo han llegado a un punto de avance tal que son muy parecidos al medio tubárico/uterino natural, proveyendo de esta manera el ambiente más adecuado para el desarrollo embrionario. Esta evolución ha sido acompañada por el desarrollo de incubadoras que emplean las mismas concentraciones de gases que el embrión encuentra en las trompas y el útero y por el desarrollo de mejores plásticos para realizar un cultivo exitoso.

Los catéteres de transferencia han sido mejorados a punto tal que la dificultad en el procedimiento prácticamente ha desaparecido.

Para aquellos embriones que por alguna causa deben ser criopreservados hoy contamos con la vitrificación que nos provee de un método de alta eficiencia y que nos asegura que el embrión tendrá la misma chance de implantar que si hubiera sido transferido en fresco.

Finalmente, hoy tenemos la capacidad de evaluar la conformación cromosómica y, en algunos casos, genética del embrión para determinar cuál es el mejor embrión para transferir.

Pese a todos estos logros todavía hay una gran cantidad de embriones que no implantan o, más aún, implantan pero no logran continuar su evolución en muchas pacientes en reiteradas oportunidades. Recientes trabajos han demostrado que pese a transferir embriones de excelente morfología, con buena velocidad de crecimiento y que revelaron ser euploides luego de un análisis cromosómico, todavía hay un 30% de ellos que fallan y no logran implantar (Hardarson et al., 2015). Además, se sabe que al menos 15-20% de los embarazos registrados abortan no logrando llegar a término (Larsen et al., 2013).

Hasta el presente no se ha logrado una estrategia terapéutica exitosa para las fallas de implantación y los abortos recurrentes. Es claro que, si bien se ha avanzado mucho en el estudio de la implantación embrionaria, todavía quedan por resolver cuestiones aún desconocidas sobre el proceso que se nos presenta como una “caja negra” de difícil abordaje.

En este trabajo se presenta una nueva perspectiva sobre el tema, mostrando evidencia de una importante participación del endometrio decidualizado en el éxito de la implantación. De esta forma surge la posibilidad de lograr nuevas opciones terapéuticas.

Aquí se presenta al epitelio endometrial con la capacidad para reconocer y responder a un embrión de buena calidad, dándole al epitelio decidualizado la función de seleccionar al embrión. Si bien este nuevo modelo requiere mayor validación, abre un nuevo horizonte para la investigación y el tratamiento de la insuficiencia reproductiva temprana.

Existe una notable prevalencia de aneuploidías en los embriones humanos, lo cual exige el desarrollo de medios eficaces de prevención de la implantación de estos embriones cromosómi-

camente anormales y que no deberían desarrollar un embarazo. El trabajo sugiere que la menstruación ha surgido como una estrategia adaptativa para la detección temprana y el rechazo activo del desarrollo de embriones anormales, proponiendo que la regeneración cíclica del endometrio proporcionaría un mecanismo para reponer el endometrio manteniendo la capacidad de receptividad y selectividad, lo que aumenta la probabilidad de éxito reproductivo. En presencia de un embrión de buena calidad es probable que la respuesta del epitelio sea interpretar y amplificar sus señales, haciendo que la capa decidual sea más receptiva a la invasión del trofoblasto. Por el contrario, en presencia de un embrión de mala calidad no se activa el envío de señales.

Existe suficiente evidencia experimental y clínica que apoya este modelo en el que se presenta una respuesta endometrial de dos tipos: selección y reconocimiento de la implantación embrionaria. Las aplicaciones de este modelo en la clínica poseen un gran potencial. Hasta el presente, las intervenciones clínicas dirigidas a tratar la falla de implantación y el aborto recurrente han sido ineficaces. Una mayor comprensión de estos procesos fisiológicos puede revelar que el fallo de implantación reiterado y el aborto recurrente son causados por un desequilibrio funcional de este sistema endometrial. En el caso del fallo reiterado de implantación reflejando un fenotipo “sobreselectivo” en el del aborto recurrente mostrando un endometrio insuficientemente exigente.

Queda como interrogante el desentrañar los procesos moleculares que controlan la transición adecuada de un fenotipo de endometrio receptivo a uno selectivo. Una vez aclarado esto completamente, se esperan nuevos y efectivos métodos para modular la implantación. De esta forma podremos dar respuesta a numerosas pacientes que presentan fallas reiteradas de implantación y abortos recurrentes de origen desconocido.

Comentario

Dr. Alberto Valcárcel

La gran mayoría de las pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad, producen embriones para transferir, pero sólo una parte de ellos logra una implantación adecuada. La mayor parte de los embriones transferidos no implanta, o implantan y se pierden tempranamente.

Históricamente, se ha responsabilizado de estas pérdidas tempranas a las alteraciones cromosómicas presentes en los embriones. Así, a lo largo de su vida reproductiva, el endometrio de una mujer recibe una gran cantidad de embriones poco viables, de los que debe evitar su implantación.

Este trabajo pretende explicar una estrategia evolutiva para prevenir esta situación. Estos autores describen, a partir de una creciente evidencia científica disponible, el modelo del endometrio decidualizado como biosensor de la calidad embrionaria. Según postulan, esta capacidad como biosensor radica en el fenotipo decidual. El embrión envía una señal, la cual es detectada por el endometrio, el que interpreta y da una respuesta permitiendo o no la implantación. De esta manera, existiría una respuesta en dos etapas del endometrio que incluiría el reconocimiento y la selección embrionaria. En la primera de ellas estaría involucrado el epitelio luminal. Una vez que el embrión ha traspasado con

éxito el epitelio luminal, continúa la siguiente etapa, donde las células deciduales activan la migración y la encapsulación del embrión en el estroma endometrial. Si alguna de estas dos etapas fallan, el embrión no será evolutivo. Esta visión activa de las células deciduales durante la implantación permite abrir un nuevo campo de investigación aplicable a las fallas de implantación, fenómeno que se presenta muy frecuentemente en las técnicas de reproducción asistida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis S, Molnar L, Gunnarsson K, Wikland M. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril* 2015;104:1452-9.
2. Kim SM, Kim JS. A review of mechanisms of implantation. *Dev Reprod* 2017;21:351-9.
3. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 2013;11:154.

NOVEDAD BIBLIOGRÁFICA

Desarrollo independiente del epitelio y del estroma endometrial dentro de la misma endometriosis

Independent development of endometrial epithelium and stroma within the same endometriosis

Michael Noe, Ayse Ahyar, Tian-Li Wang y Le-Ming Shih

Journal of Pathology 2018;245(3):265-9

Resumen

La patogénesis de la endometriosis, una enfermedad común, benigna pero debilitante en las mujeres, permanece elusiva. La teoría actualmente sostenida de las *stem cells* postula que células progenitoras/*stem* circulantes son depositadas fuera del útero donde se diferencian en estroma y tejido glandular para establecer la endometriosis. Para contrastar esta hipótesis es fundamental dilucidar la evolución de ambos tipos de tejido. Aquí aplicamos PCR digital en gotas para analizar mutaciones pasajeras somáticas sin sentido y sinónimas, que son neutrales respecto de la selección clonal, entre seis lesiones

endometriósicas no superficiales. Encontramos que de entre 19 mutaciones secuenciadas, todas estaban significativamente enriquecidas en componentes epiteliales pero no en estromales en cada lesión examinada. Nuestros datos indican que la evolución de la endometriosis no superficial es compleja, que el epitelio es clonal y que su desarrollo es independiente del estroma, proveyendo una nueva visión en la génesis de la endometriosis.

Este trabajo ha sido comentado por Lac y Huntsman en "Distinct developmental trajectories of endometriotic epithelium and stroma: implications for the origins of endometriosis".