

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Casa abierta al tiempo**

**ALOTRASPLANTE TUBO-OVÁRICO COMO "UNIDAD  
ANATOMO-FUNCIONAL" EN LA CONEJA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. MANUEL MARTÍNEZ MERAZ**

**DIRECTORAS DE TESIS:**

**DOCTORA MA. CRISTINA REVILLA MONSALVE**

**DOCTORA MARISA CABEZA SALINAS**

**ASESOR:**

**DOCTOR RUBÉN ROMÁN RAMOS.**

**MÉXICO, D.F.**

**2007.**

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de postgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93**

**El alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana**

**Manuel Martínez Meraz**

**Recibió Beca Institucional Convenio No. 2006/2690.**

**El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas  
y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco**

**aprobó la tesis que presentó:**

**M. en C. Manuel Martínez Meraz**

**El día 2 de mayo del 2007**

**Sinodales:**

**DOCTORA MARISA CABEZA SALINAS**

-----

**DOCTORA MA. CRISTINA REVILLA MONSALVE**

-----

**DOCTOR RUBÉN ROMÁN RAMOS**

-----

**DOCTOR VICTOR SAÚL VITAL REYES**

-----

**DOCTOR SERGIO AGUSTIN ISLAS ANDRADE**

-----

## **I. COMITÉ TUTORAL.**

### **DIRECTORAS DE TESIS:**

#### **DOCTORA MA. CRISTINA REVILLA MONSALVE**

**Investigadora Titular A de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas. Coordinación de Investigación en Salud del C.M.N. Siglo XXI, I.M.S.S.**

**Profesora de Asignatura "B" de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M.  
Investigadora Nacional Nivel I**

#### **DOCTORA MARISA CABEZA SALINAS.**

**Profesora Titular C del Departamento de Sistemas Biológicos. División CBS.  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.  
Investigadora Nacional Nivel I**

### **ASESOR:**

#### **DOCTOR RUBÉN ROMÁN RAMOS.**

**Profesor Titular C del Departamento Ciencias de la Salud. División CBS.  
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.  
Investigador Nacional Nivel II.**

### **SINODALES:**

#### **DOCTOR VICTOR SAÚL VITAL REYES.**

**Jefe del Departamento Clínico de Biología de la reproducción y Ginecoendocrinología. Hospital de Gineco-Obstetricia del Centro Médico La Raza del I.M.S.S. Investigador Asociado C. Coordinación de Investigación en Salud del C.M.N. Siglo XXI, I.M.S.S.**

#### **DOCTOR SERGIO AGUSTIN ISLAS ANDRADE.**

**Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas.  
Investigador titular "A" de la Coordinación de Investigación en Salud del C.M.N. Siglo XXI, I.M.S.S.  
Investigadora Nacional Nivel I**

**La presente investigación se realizó en el departamento de Cirugía Experimental y Bioterio. Coordinación de Investigación en Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.**

**En la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas. Coordinación de Investigación en Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social**

## **II. AGRADECIMIENTOS**

**Agradecemos a:**

**Al laboratorio Novartis de México, por el donativo de Ciclosporina Sandimun Neoral.**

**Johnson and Johnson Medical México, por el donativo del material de sutura.**

**Dow Corning de México, por el donativo del tubo de silastic.**

**Al Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Xochimilco por el donativo de las conejas blancas Nueva Zelanda**

**Al Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el donativo de las conejas blancas Nueva Zelanda.**

**Beckman Coulter México, por el donativo de kits para Estradiol, Progesterona, FSH y LH.**

### **III. DEDICATORIA**

**Doy gracias a Dios por que soy creyente,**

**a mis padres q.e.d.,**

**a mis hermanos,**

**a Margarita, madre de mis hijas,**

**a mis hijas Monserrat y Melisa,**

**a mis amigos,**

**y a la vida .....**

**A todos ellos, que de una u otra manera intervinieron en la realización de este trabajo que hoy presento ante ustedes y que es continuación de un proyecto de investigación que he llamado “Trasplante de Órganos en Ginecología” Estudio Experimental, en el que inicié a trabajar desde el año de 1990 y que continuaré trabajando en el mismo, a pesar de los incontables tropiezos, obstáculos y objeciones que he encontrado en el camino, así pues, persistiré trabajando en el mismo proyecto de investigación, hasta hacerlo una realidad clínica.**

**Manuel M. Meraz**

## **INDICE**

<b>I</b>	<b>COMITÉ TUTORAL</b>
<b>II</b>	<b>AGRADECIMIENTOS</b>
<b>III</b>	<b>DEDICATORIA</b>
<b>IV</b>	<b>RESUMEN</b>
<b>V</b>	<b>ABSTRACT</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>
<b>3</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>
<b>5</b>	<b>HIPÓTESIS</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>
<b>A</b>	<b>GRUPOS DE ESTUDIO</b>
<b>B</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA</b>
<b>C</b>	<b>EVALUACIÓN POSTOPERATORIA</b>
<b>D</b>	<b>DETERMINACIONES HORMONALES</b>
<b>E</b>	<b>FERTILIDAD</b>
<b>F</b>	<b>EXPLORACIÓN QUIRÚRGICA</b>
<b>G</b>	<b>ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</b>
<b>8</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>
<b>9</b>	<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS</b>
<b>10</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>11</b>	<b>DISCUSIÓN</b>

- 12      CONCLUSIONES**
- 13      PERSPECTIVAS**
- 14      BIBLIOGRAFIA**
- 15      ANEXO 1**
- 16      PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES INTERNACIONALES  
RELACIONADAS CON LA TESIS.**

#### IV. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la función endocrina y reproductiva de conejas tubo-ovariectomizadas con alotrasplante tubo-ovárico ortotópico como “unidad anatómo-funcional”, empleando una técnica de microcirugía vascular.

Se utilizaron 55 conejas Nueva Zelanda Blancas (NZB), no consanguíneas y 6 machos de fertilidad probada. Las conejas se dividieron en 5 grupos experimentales: El grupo A (n=20) donadoras, se les efectuó salpingooforectomía derecha, que fue el aloinjerto donado, seguida de histerectomía más salpingooforectomía izquierda y eutanasia. El grupo 1 (n=10) Control sin la administración de ciclosporina (CsA), a las que se les realizó salpingooforectomía izquierda (SOI). El grupo 2 (n=10) alotrasplante sin la administración de CsA, se les efectuó salpingooforectomía bilateral (SOB), seguida de alotrasplante tubo-ovárico derecho, ortotópico. El grupo 3 (n=10) Alotrasplante con la administración de CsA, se les realizó salpingooforectomía bilateral, seguida de alotrasplante tubo-ovárico derecho, ortotópico. A las conejas se les administró CsA 10 mg/kg/día durante los primeros 21 días, para continuar con 5 mg/Kg/día durante el resto del estudio. El grupo 4 (n=5) Control con la administración de CsA, a las que se les realizó salpingooforectomía izquierda y se les administró CsA, con el mismo esquema que al grupo 3.

Durante el estudio se determinaron los siguientes parámetros: permeabilidad de la anastomosis tubaria y vascular; niveles séricos de estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ), hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH); fertilidad, número de crías por camada, grado de adherencias, estudio histopatológico de úteros, trompa de Falopio y ovario.

Los resultados mostraron que hubo permeabilidad inmediata de las anastomosis tubarias en el 100% de los casos y una permeabilidad tardía en el 15%. La permeabilidad inmediata de las anastomosis vasculares fue del 92.5% mientras que la tardía fue del 16.6%.

Se determinaron los niveles séricos de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, FSH y LH al inicio del experimento (basal), a la 2<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> semanas después de la cirugía. Los resultados en los grupos 1, 3 y 4, mostraron un incremento significativo en los niveles séricos de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, en la 6<sup>a</sup> semana, que correspondieron a la segunda semana de gestación, comparados con los niveles de las hormonas del grupo 2 ( $p < 0.05$ ). En el grupo 2, hubo un incremento significativo en los niveles séricos de LH y FSH en la semana 10, comparado con los niveles de LH y FSH de los grupos 1, 3 y 4 ( $p < 0.05$ ).

En el grupo 1, control, sin la administración de CsA, el 87.5% de las conejas quedaron gestantes. En el grupo 4, control, con la administración de CsA, todas las conejas, quedaron gestantes. En el grupo 2, de alotrasplante sin la administración de CsA, todas las conejas, presentaron rechazo al aloinjerto y ninguna coneja quedó gestante. En el grupo 3, de alotrasplante con la administración de CsA, tres conejas (37.5%) no presentaron rechazo, solamente una coneja resultó gestante, lo que correspondió al 12.5% de los animales, y en dos conejas más se restableció la función endocrina (37.5%).

Se puede concluir que el alotrasplante tubo-ovárico como "unidad anatómico-funcional", con la administración de CsA, restableció la función endocrina en el 37.5% de los casos y en el 12.5% restableció la fertilidad.

## V. ABSTRACT

The aim of this study was to re-establish the endocrine and reproductive function in tubal-ovariectomized rabbits using orthotopic tubal-ovary allotransplants as the “anatomical-functional unit” with a vascular microsurgical technique.

Fifty-five White New Zealand, non-consanguineous rabbits and 6 confirmed-fertile males were used. The rabbits were divided into 5 experimental groups: group A (n=20) was comprised by donors submitted to right salpingo-oophorectomy which served as the donated allo-graft followed by hysterectomy plus left salpingo-oophorectomy and euthanasia. To control group 1 (n=10) no cyclosporin (CsA) was administered and was submitted to left salpingo-oophorectomy (SOI). Group 2 (n=10) was the allotransplant group and did not receive CsA. They were submitted to bilateral salpingo-oophorectomy, followed by orthotopic right tubal-ovarian allotransplant.

10 mg/kg/day of CsA was administered to rabbits for the first 21 days, and 5 mg/kg/day for the rest of the study. Control group 4 (n=5) received CsA just as group 3 and were submitted to left salpingo-oophorectomy.

During the study the following parameters were measured: permeability of the tubal and vascular anastomosis, estradiol ( $E_2$ ), progesterone ( $P_4$ ), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), number of babies per litter, degree of adherences, histopathological study of the uteri, Fallopian tubes and ovaries.

The results showed that there was immediate permeability of the tubal anastomosis in 100% of the cases and a late permeability of 15%. Immediate permeability of the vascular anastomosis was 92.5%, while late permeability was 16.6%.

Serum E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, FSH and LH levels were measured at the start of the study (baseline), during the second, sixth and tenth week after surgery. Groups 1, 3 and 4 showed a significant increase in serum E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> levels corresponding to the second week of gestation, compared to the group 2 hormone levels ( $p < 0.05$ ). Group 2 showed a significant increase in serum LH and FSH levels during week 10, compared to the serum LH and FSH levels of groups 1, 3 and 4 ( $p < 0.05$ ).

In group 1 (control group) 87.5% of the rabbits were gestating. With the administration of CsA, all of the rabbits in group 4 (control) became pregnant. In group 2, provided the allotransplant without the administration of CsA, all of the rabbits rejected the allotransplant and none became pregnant. In group 3, provided the allotransplant and CsA, three rabbits (37.5%) did not reject the allotransplant, one rabbit became pregnant corresponding to 12.5 % of the animals and in two rabbits the endocrine function was re-established (37.5%).

It can be concluded that the tubal-ovarian allotransplant as an “anatomical-functional unit”, together with the administration of CsA, re-establishes endocrine function in 37.5% of the cases, while in 12.5% of the cases, fertility was re-established.

## **1. INTRODUCCIÓN. TRASPLANTE DE ORGANOS.**

El trasplante de órganos, como alternativa terapéutica de sustitución de un órgano que ha perdido su función, constituye, sin duda, uno de los avances científicos médicos más importante del siglo XX. Realizar los trasplantes de órganos con éxito es el resultado de un enorme y continuo esfuerzo de todas las especialidades de la Medicina, las más de las veces contra infinidad de obstáculos de índole médico, científico, legal y ético (1-4). En 1954, Murray y cols. realizaron el primer trasplante exitoso de riñón y desde entonces se han realizado más de 500,000 trasplantes de órganos sólidos (1,4). El trasplante de órganos como tratamiento sustitutivo de la función orgánica es ya una realidad clínica y no solamente experimental. En trasplante de órganos se han logrado considerables avances en los últimos 25 años, actualmente es posible ofrecer como alternativa terapéutica, trasplantes de riñón, páncreas, páncreas-riñón, hígado, hígado-riñón, pulmón, corazón, corazón-pulmón, intestino y tejidos como médula ósea (5-11).

El éxito del trasplante de órganos, se debe a la conjunción de diversos factores como son: avances en el conocimiento de la inmunología del trasplante, mejores fármacos inmunodepresores para prevenir, retardar y tratar el rechazo inmunológico, mejores soluciones de preservación de órganos, como la solución conocida como UW (por que se creó en la Universidad de Wisconsin) lo que permite mantener viable a 4 grados centígrados el riñón y el páncreas hasta 72 horas, hígado 48 horas, corazón y pulmón 12 horas, lo que ha hecho posible que el trasplante de estos órganos sea una cirugía semielectiva. El mejoramiento en las técnicas quirúrgicas como la microcirugía vascular, el desarrollo de sofisticados procedimientos de diagnóstico y manejo postoperatorio, el

mejoramiento en las Unidades de Cuidados Intensivos, la mejor disposición social para la aceptación en la donación de órganos de donador vivo y donador cadáver, el equipo transdisciplinario en el manejo integral del binomio donador-receptor, todos con entrenamiento en trasplantes de órganos, la selección del mejor donador de acuerdo a la tipificación de los antígenos de histocompatibilidad de leucocitos conocidos como HLA (human leucocyte antigen), grupo sanguíneo ABO y las pruebas cruzadas de linfocitotoxicidad (4-11).

### **TRASPLANTE DE ÓRGANOS E INMUNODEPRESIÓN FARMACOLÓGICA.**

La radiación corporal total (RCT) durante el preoperatorio, fue el primer método de inmunosupresión utilizado en la práctica clínica en trasplante de órganos.

En 1958 una mujer receptora de trasplante renal de un donador vivo no relacionado (DVNR), recibió una dosis considerada como subletal de 600 rads (unidades Roentgen) como tratamiento inmunosupresor: La paciente murió a los 15 días posteriores al trasplante debido a hemorragia secundaria a depleción plaquetaria, sin embargo, la biopsia del aloinjerto no presentó signos de rechazo (1). En 1960, la dosis de RCT pretrasplante fue reducida a 400 rads y se agregaron 100 mg/día de daltacortisona y 30 mg/día de 6-mercaptopurina (6-MP), tratando el rechazo agudo con altas dosis de corticosteroides y RCT cada semana durante un mes. El objetivo de este tratamiento era suprimir la respuesta inmune del receptor para evitar el rechazo al aloinjerto; pero las infecciones y la aplasia medular, provocaron una elevada mortalidad. En 1961, Calne en Londres, reemplazó el uso de RCT durante el pre y post-trasplante por el empleo de azatioprina (AZA), un

derivado imidazol de la 6-MP. A este tratamiento se le agregó la prescripción de corticosteroides a humanos con alotrasplante renal. Otros fármacos también utilizados fueron: el metotrexate, la ciclofosfamida y la actinomicina C o D (1).

En 1970 se aisló la ciclosporina (producida por Sandimmun, Sandoz, Suiza) a partir de cultivos de *Tolypocladium inflatum gams*, un miembro de la familia de hongos imperfectos. La ciclosporina (CsA) es un decapeptido cíclico, neutro y muy lipofílico, con un peso molecular de 1203. Este fármaco actúa, casi selectivamente, sobre los linfocitos T inhibiendo su activación y bloqueando la producción de Interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN-gamma). Este fármaco, además, interfiere en la formación de receptores para la IL-2 en los linfocitos T no activados. La disminución en la producción de IFN-gamma trae como consecuencia que el número de células presentadoras de antígeno (CPA) no aumente, con lo que el número de linfocitos T activados o sensibilizados al antígeno disminuye. Todos estos efectos son de inicio rápido y dependientes de la dosis utilizada de CsA. Por otro lado, se ha visto que este fármaco no deprime la hematopoyesis y no afecta la función de los macrófagos. La CsA se utilizó por primera vez en clínica en pacientes receptores de alotrasplante renal en el año de 1978 y se comercializó en 1983 (12,13).

Las dosis de inmunodepresores inicialmente empleadas en pacientes receptores de trasplante de órganos alogénicos fueron altas, llegando a administrarse hasta 200 mg/día de prednisona (PDN), de 4 a 8 mg/kg/día de azatioprina y hasta 25 mg/kg/día de ciclosporina (1,12). Estas macrodosis han dejado de utilizarse y todas ellas se han ajustado, con base en la experiencia obtenida a través del tiempo y con el desarrollo de nuevos fármacos, con diferentes

protocolos de tratamiento empleados como la monoterapia a base de CsA, de tacrolimus (FK506) o de esteroides. También se han utilizado tratamientos de doble esquema a base de CsA-micofenolato mofetil (MMF), tacrolimus-micofenolato, sirolimus-PDN y de triple esquema a base de CsA-PDN-AZA, CsA-MMF-PDN, entre otros.

Actualmente la dosis promedio de mantenimiento para PDN es de 5-10 mg/día, 1 mg/kg/día de AZA y de 4-8 mg/kg/día de CsA, con lo cual se evita el rechazo del organismo al aloinjerto, sin depresión significativa del sistema inmune y con menor riesgo de infección, toxicidad y malignidad, que resultan ser dosis-tiempo-dependiente. En 1993 Opelz (14) informó de un estudio en el que se incluyeron a 22,152 pacientes receptores de trasplante renal de donador cadáver, de 150 centros de trasplante; este autor encontró que la supervivencia del aloinjerto renal, después de un año de la cirugía, fue del 100% con cualquiera de los 5 diferentes esquemas de inmunodepresión empleados: CsA+AZA, CsA, CsA+PDN, CsA+PDN+AZA y AZA+PDN. A los dos años la supervivencia del aloinjerto fue del 97% utilizando CsA+AZA y a los cinco años la mejor supervivencia del aloinjerto fue del 86% empleando la misma combinación de CsA+AZA.

Otros inmunodepresores que se administran a pacientes receptores de alotrasplantes de órganos, son agentes biológicos como los anticuerpos antilinfocitarios monoclonales (OKT-3), muromonab-CD3, basiliximab (Simulect) y daclizumab (Zenapax) y policlonales (MALG globulina antilinfoblástica de Minnesota), gengraf, entre otros, con buenos resultados (15-17).

## **RIESGO DE MALIGNIDAD EN PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTES DE ÓRGANOS.**

A nivel mundial hasta 1992 se habían efectuado más de 300,000 trasplantes de órganos sólidos que incluían riñón, corazón, hígado, páncreas y corazón-pulmón, por otro lado, y de acuerdo a los datos del Cincinnati Transplant Tumor Registry (CTTR), hasta diciembre de 1993, se habían reportado a nivel mundial 7,766 cánceres que se originaron en 7,316 receptores de trasplantes de órganos, incluyendo receptores de médula ósea. Del total de cánceres registrados por la CTTR, los cánceres más frecuentes fueron: cánceres no melanomas de piel y labios 37.16 %, linfoma no Hodgkin 16.36 %, carcinomas pulmonares 5.48 %, carcinoma cervico-uterino 4.09 %, sarcoma de Kaposi 3.98 %, carcinomas de colon y recto 3.59 % y carcinomas mamarios 3.15 %. La prevalencia de series diversas y grandes de receptores de aloinjertos renales y cardiacos tuvieron un promedio del 6 %. El intervalo entre el trasplante y la aparición de la neoplasia en el sarcoma de Kaposi (KS) fue de 21 meses como promedio. Los linfomas, se expresaron en un promedio de 32 meses. Otras neoplasias, con excepción de carcinoma de vulva y perineo, se manifestaron en promedio a los 69 meses. Los carcinomas de vulva y perineo, aparecieron en promedio a los 112 meses. Si se consideran los 7,766 cánceres, el tiempo promedio de su aparición fue de 61 meses, esto es 5 años 1 mes (18). En la población general transcurren de cinco a veinte años, o incluso más, entre la exposición a carcinógenos y la aparición de tumores. Los cánceres malignos que se observan a menudo en la población general como carcinoma de pulmón, mama, próstata, colon y cervico-uterino, no mostraron incremento e incluso hubo disminución en la población trasplantada. Los tumores se produjeron en pacientes

cuya edad promedio en el momento del trasplante fue de 42 años, el 43% eran menores de 40 años. La edad promedio de los pacientes en el momento del diagnóstico de sus neoplasias fue de 47 años. Del total, 66 % eran varones y 34 % mujeres, lo que conserva la tasa de 2:1 entre varones y mujeres que se someten a un trasplante. Una proporción importante de las lesiones neoplásicas experimentan regresión parcial o total después de reducir o interrumpir el tratamiento inmunosupresor, muchos de estos pacientes con neoplasias fueron sometidos a intensa inmunosupresión, encontrando una relación dosis-tiempo-dependiente. En trasplante de órganos, aunque el cáncer es una complicación, debe insistirse en que una proporción importante de los receptores de aloinjertos de órganos vitales, no tienen problemas de esta clase. Su aparición se relaciona con el tratamiento inmunosupresor durante muchos años y en forma intensiva, como ocurre en pacientes que presentan disfunción crónica del aloinjerto con rechazo agudo inmunológico, en donde la prioridad es conservar la vida del paciente manteniendo la función del aloinjerto con dosis máximas.

## **RIESGO DE INFECCIONES EN PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS.**

El régimen de inmunodepresión farmacológica aunado a los diversos factores de riesgo que predisponen a un paciente receptor de trasplante de órganos a infección, incluyen, entre otros: la falla orgánica terminal y múltiple, diabetes mellitus, historial previo de hepatitis B y C, leucopenia, esplenectomía, viremia persistente, el uso de órganos cadavéricos y los tratamientos repetidos para evitar el rechazo persistente o recurrente. Estos dos últimos factores son los más importantes, ya que

para que el paciente receptor sobreviva al trasplante se requiere que éste sea expuesto a dosis mayores o repetidas de agentes inmunodepresores por largos períodos de tiempo.

La inmunodepresión farmacológica es un "arma de doble filo" porque protege el órgano trasplantado del sistema inmune del receptor pero, a su vez, causa que el receptor sea más susceptible a infecciones. Los receptores de trasplantes están en mayor riesgo de contraer infecciones tanto comunes como oportunistas. Estas infecciones pueden surgir del órgano trasplantado, como complicaciones quirúrgicas, o bien, se pueden reactivar las infecciones latentes en el huésped o puede haber infección por exposición ambiental a nuevos agentes. Las enfermedades infecciosas en esta población de pacientes varían en un patrón predecible, dependiendo del órgano trasplantado, el régimen inmunodepresor utilizado y el curso postoperatorio.

En 1991 Rubin (19) desarrolló un esquema que demostró cómo ocurren las infecciones en pacientes tratados con ciclosporina y prednisona después de un trasplante de riñón; este esquema fue modificado en 1994 por Nicholson y Johnson (20). En general, las infecciones que ocurren durante el primer mes después del trasplante surgen debido a que el agente infeccioso ha estado en contacto con el huésped antes de la cirugía en el tejido donado o como complicación infecciosa postoperatoria, estas últimas son iguales a las que se observan en cualquier paciente quirúrgico. En el período de un mes a seis meses después del trasplante se favorecen las infecciones oportunistas debido a los altos niveles de inmunodepresión que se requieren para evitar el rechazo. El período de seis meses a un año representa un período donde las infecciones bacterianas vuelven a ser

importantes. En este período, las infecciones por hongos y micobacterias son también muy importantes. En la tabla 1 se describe los tiempos en que se presentan las infecciones más comunes en pacientes trasplantados (20):

**Tabla 1.** Infecciones más comunes en trasplante de órganos.

Tiempo	Infección
0 a 1/2 mes	Hepatitis B Infecciones bacterianas Heridas Neumonías Líneas vasculares Orina (bacteriana, pielonefritis)
1/2 mes a 1 mes	Hepatitis B Herpes simples
1 mes en adelante	Citomegalovirus Hepatitis C Pneumocistis carinii* Toxoplasmosis* Hongos Tuberculosis Nocardia
2 meses en adelante	Epstein-Barr** Varicela zoster** Papovavirus** Adenovirus** Criptococo
5 meses en adelante	Neumonías adquiridas en la comunidad Infección de orina

\* 1-6 meses

\*\* 2-6 meses

Es importante resaltar que los pacientes con falla orgánica terminal, son más susceptibles a infecciones que los individuos sanos. El futuro receptor de un trasplante debe evaluarse inicialmente con un historial y examen físico completo para determinar la susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Es también

importante determinar las infecciones que han ocurrido antes del trasplante. Estas se deben evaluar con detenimiento, por ejemplo, se debe indagar si hay historia de exposición a tuberculosis y, en caso afirmativo, realizar prueba para el PPD (derivado de proteína purificado), hepatitis B, y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). También se debe investigar acerca de lesiones herpéticas recurrentes, varicela e infecciones por hongo. Se deberá investigar también si el paciente reside en un área endémica para *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *Strongyloides stercoralis*. Los pacientes con problemas de infecciones dentales o de senos nasales deben ser tratados y resueltos antes del trasplante. Las radiografías ayudan a diagnosticar caries e infecciones en senos paranasales. Al igual que el receptor, el donador de órganos también debe de pasar por una evaluación extensa para descartar la presencia de infecciones. Los donadores que son portadores del virus VIH o que son positivos para el antígeno de superficie de hepatitis B se deben excluir como donadores de trasplantes. Muchas veces los órganos que se donan y las soluciones con las que se perfunden durante el transporte son cultivados para detectar infecciones asintomáticas del donador o contaminación del órgano durante el proceso de escisión. Finalmente, para disminuir el riesgo de infección en el paciente receptor de trasplante de órganos, aunado a lo comentado anteriormente, se administra profilaxis antimicrobiana de manera específica para cada órgano a trasplantar.

### **EMBARAZO EN RECEPTORAS DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS.**

En 1958 una paciente de 23 años de edad receptora de trasplante renal con embarazo de 41 semanas, parió un niño sano con peso de 3300 g (21) y éste

fue el primer nacimiento en una paciente trasplantada. Este acontecimiento alertó a la comunidad médica acerca del reinicio de la función reproductora posterior al trasplante de órganos. En el año de 1991 se fundó el National Transplantation Pregnancy Registry (NTPR) en la Universidad de Thomas Jefferson, U.S.A. (22) con el objetivo de crear una base de datos para evaluar los resultados de los embarazos de receptoras de trasplante de órganos y de aquellos engendrados por varones receptores de trasplante. En Europa se crearon dos centros de registro de embarazo en receptoras de trasplante de órganos, en 1994 The United Kingdom Transplant Pregnancy Registry (23) y en 1998 The European Diálisis and Transplant Association Registry (24). En 2006 McKay (25), revisando los reportes de los tres centros, encontró que la tasa de aborto espontáneo, aborto terapéutico, óbito, embarazo ectópico, parto pretérmino, bajo peso al nacimiento y muerte neonatal, fue similar en los tres centros. Encontró que hasta el 2002, se habían reportado 14 mil nacimientos en receptoras de trasplante de órganos en la literatura médica mundial. La NTPR en el año de 2004 (25) reportó 1400 embarazos en receptoras de riñón, hígado, hígado-riñón, páncreas-riñón, corazón, corazón-pulmón y pulmón. La mayoría de los embarazos, 1100 fueron en pacientes con trasplante renal.

La National Transplantation Pregnancy Registry en su reporte de 1999 (26) llegó a las siguientes conclusiones:

1. Mientras la mayoría de las receptoras de trasplante de riñón toleran bien el embarazo, un pequeño porcentaje de receptoras desarrollan rechazo, disfunción y/o deterioro del injerto.
2. No se han observado malformaciones estructurales en los hijos de receptoras

expuestas a micofenolato.

3. Las biopsias de hígado en receptoras de trasplante de hígado, demostraron rechazo agudo durante el embarazo y con mayor riesgo para ambos, con pobres resultados para el recién nacido y en la madre con recurrentes episodios de rechazo.
4. Las receptoras de trasplante de páncreas-riñón, durante el embarazo, pueden mantenerse en normoglucemia, cursan con alta incidencia de hipertensión materna, prematuridad y bajo peso al nacimiento.
5. En receptoras de trasplante de corazón o de pulmón, el embarazo no resultó ser predictor adverso específico.
6. No se han observado malformaciones estructurales o incapacidad de aprendizaje en hijos de madres tratadas con ciclosporina (seguimiento de 4 - 5 años).
7. Se deberán estudiar los nuevos esquemas de tratamiento, así como las nuevas combinaciones de inmunodepresores.

Es importante hacer notar el grado de rehabilitación en el paciente trasplantado, con el hecho de que mujeres trasplantadas se han embarazado desde la década de los años cincuentas y cada día aumenta el número de embarazos en receptoras trasplantadas de algún órgano. El embarazo es actualmente una parte de los beneficios permitidos a una mujer receptora de trasplante de órgano(s).

## **RIESGO DE TERATOGENICIDAD EN HIJOS DE MADRES RECEPTORAS DE TRASPLANTE DE ÓRGANOS.**

Una de las preocupaciones en la comunidad médica de trasplantes, es la posibilidad de que las dosis terapéuticas de agentes inmunodepresores administrados en el transcurso del embarazo puedan causar malformaciones en el recién nacido.

En animales de experimentación como la coneja y la rata la administración de ciclosporina o de prednisona a dosis muy altas ha demostrado ser teratogénica, pero con dosis menores en las mismas especies, estos fármacos inmunodepresores, no fueron teratogénicos (27-29). Diversos investigadores han revisado la toxicidad para el feto de tres agentes inmunodepresores comúnmente utilizados: ciclosporina, prednisona y azatioprina. La azatioprina es teratogénica en ratones a dosis elevadas de hasta 20 mg/kg. Se han observado malformaciones esqueléticas en conejos a dosis de 5-15 mg/kg. Sin embargo no se ha advertido un incremento en la incidencia de malformaciones estructurales neonatales en el humano recién nacido, aún utilizando dosis máximas en la mujer embarazada de hasta de 2 mg/kg/día (28). Aunque la prednisona no es genotóxica, ha mostrado ser teratogénica en animales cuando se utiliza a dosis más elevadas que las empleadas clínicamente (27). La ciclosporina tiene efectos embriotóxicos y fetotóxicos únicamente a niveles de dosificación que producen toxicidad materna y que son equivalentes a, por lo menos, el doble de los utilizados en humanos. Otros agentes inmunodepresores comúnmente utilizados en mujeres embarazadas receptoras de trasplante de órganos son FK-506 (tacrolimus), micofenolato y rapamicina.

En 2001 Bar y cols. (30) publicaron un estudio de meta-análisis, de los

resultados del uso de la ciclosporina durante el embarazo cuyo objetivo era conocer si su empleo durante la gestación estaba asociado a un incremento en el riesgo de la incidencia en malformaciones congénitas y parto pretérmino. Encontraron que la prevalencia global de malformaciones congénitas en la población estudiada (4.1%) no varió substancialmente de la reportada en la población general, y que el incremento en la tasa de prematuridad (56.3%) podría estar asociado al empleo de diversos fármacos durante el embarazo, por ejemplo el empleo de diversos agentes antihipertensivos.

El tacrolimus (FK-506) también tiene efectos adversos, pero únicamente a dosis tóxicas, en animales de experimentación, y sin deterioro de la fertilidad. En 2000 Kainz y cols. (31) reportaron en un estudio de revisión el resultado de 100 embarazos en 84 mujeres tratadas con tacrolimus, concluyeron que el embarazo en receptoras de trasplante de órganos tratadas con tacrolimus, resultó en curso favorable y las complicaciones de la madre y neonato fueron similares a las descritas con el empleo de otro agentes inmunodepresores.

No se ha demostrado teratogenicidad con el empleo de inmunodepresión farmacológica en la mujer embarazada, la evidencia epidemiológica, indica que la frecuencia de anormalidades congénitas en los hijos de madres receptoras de trasplantes de órganos, es semejante a la frecuencia observada en la población general (25, 26, 32).

### **Fármacos inmunodepresores durante el embarazo.**

De acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA) (26), la actual categoría de fármacos inmunodepresores empleados durante el embarazo son:

Categoría A: estudios controlados, sin evidencias de riesgo.

Categoría B: sin evidencia de riesgos en humanos, para los corticosteroides.

Categoría C: el riesgo puede no ser la regla, para la ciclosporina, micofenolato, tacrolimus y rapamicina.

Categoría D: evidencias positivas de riesgo, para la azatioprina.

Categoría X: contraindicados en el embarazo. Ninguno de los utilizados.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **TRASPLANTE DE ÓRGANOS EN GINECOLOGÍA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA.**

**Trasplante de ovario.** El trasplante de ovario en cirugía experimental fue descrito por primera vez en 1863 en conejas por Bert (33), observó que el ovario implantado en la cavidad abdominal se revascularizaba. El se percató de la importancia del trasplante de órganos para el estudio de la fisiología y sus posibles implicaciones terapéuticas. En 1895 Morris (34), con el objetivo de restaurar la función ovárica, realizó el primer implante alogénico de ovario en una mujer de 20 años con diagnóstico de falla ovárica prematura. El injerto se colocó por vía abdominal en el fondo del útero. Dos meses después del implante de ovario, la receptora presentó su primera menstruación con duración de 10 días. También en 1895, Morris realizó un autoimplante de ovario, con el objetivo de restaurar la fertilidad, en una mujer de 26 años con diagnóstico de enfermedad pélvica inflamatoria severa, el injerto ovárico fue colocado en el muñón de un oviducto, la paciente llegó a embarazarse un mes después, pero abortó al tercer mes de gestación.

De 1895 a 1930 se publicaron en la literatura médica internacional 36

artículos que reportaban un total de 665 casos de implante de ovario en la mujer (35) con diversos resultados que hoy se interpretan como dudosos. El rechazo al aloinjerto y la aparición de la terapia hormonal de reemplazo fueron los motivos por los cuales se abandonó este tratamiento.

En 1902, Carrel describió la técnica de anastomosis vascular en trasplante de órganos en animales de experimentación y en 1906 junto con Guthrie, ambos pioneros en trasplante de ovario con técnica de cirugía vascular, efectuaron el primer alotrasplante de ovario junto con su pedículo vascular y un segmento de aorta y cava con anastomosis vascular término-lateral (t-l) cava-cava y aorta-aorta, en gatas (36).

### **Trasplante de trompa de Falopio y de ovario.**

En 1946, Ritala reportó 10 casos de implante tubario en la mujer (5 casos de aloimplante y 5 casos de autoimplante), con el objetivo de restaurar la fertilidad, pero sin éxito (37). El alotrasplante tubario con técnica de cirugía vascular en animales (experimental) y en la mujer (clínico), sin utilizar el microscopio quirúrgico, fue reportado por Cohen en 1974 y 1976 respectivamente (38-40).

En 1960 Jacobson (41), y Chase, Fisher, Smith (42-44) entre otros, establecieron las bases para el desarrollo de la microcirugía vascular experimental y más tarde clínica en todas las especialidades médico-quirúrgicas.

La cirugía ginecológica experimental con técnica quirúrgica microvascular se inició en 1974 con Winston y McBrouwn (45), quienes realizaron en conejas 4 autotrasplantes de trompa de Falopio con el objetivo de restablecer la fertilidad y para facilitar la técnica quirúrgica incluyeron al ovario, obteniendo el éxito con dos

conejas gestantes.

En 1978 Wood y cols. (46) con el objetivo de restablecer la fertilidad, realizaron el primer trasplante alogénico de trompa de Falopio con técnica de cirugía microvascular, en una mujer con el antecedente de pérdida de ambos oviductos como resultado de dos embarazos ectópicos previos. Utilizaron a su hermana como donadora viva relacionada (DVR). Donadora y receptora resultaron compatibles en HLA, grupo sanguíneo y con prueba de linfocitotoxicidad negativa. A la receptora se le efectuó salpingooforectomía derecha, para desechar el ovario y trasplantar exclusivamente la trompa de Falopio que incluyó la porción intramural y el pedículo vascular con los vasos ováricos. No realizó perfusión del injerto. El sangrado total en la receptora, durante el transoperatorio fue de 2,500 ml. Solamente registraron el tiempo quirúrgico del trasplante que fue de 13 horas. El régimen inmunosupresor empleado fue prednisolona 100 mg/día dosis inicial y 20 mg/día dosis de sostén; azatioprina 1 mg/kg/día durante seis meses sin observar ningún efecto colateral ni tóxico. El injerto se retiró seis meses posteriores al trasplante, lo encontraron no viable, con necrosis coagulativa y sin aparente rechazo inmunológico, no lograron el embarazo.

El trasplante tubario, en la mujer, se ha intentado hasta el momento actual en 21 casos, en diversas modalidades como autoimplante, aloimplante y alotrasplante, con técnica de cirugía macrovascular y microcirugía vascular, con y sin empleo de inmunodepresión farmacológica, sin haberse logrado el embarazo en ninguno de los casos reportados (46-48).

En 1985, Silber comunicó (49) un trasplante tubo-ovárico entre gemelas idénticas. La receptora, declarada infértil por enfermedad pélvica inflamatoria

severa, la cual había destruido ambas trompas y ovarios, la donadora, con antecedente de ligadura tubaria posterior a tres hijos y nuevo matrimonio, deseaba recanalización tubaria para volver a embarazarse. La donadora se embarazó a los dos meses del postoperatorio y la receptora se encontraba produciendo estrógenos con menstruaciones regulares.

En 1987, Von Theobald y cols. (50) informaron del primer autotrasplante heterotópico de ovario, con técnica de cirugía microvascular, además de transposición lateral intraperitoneal del ovario izquierdo, con el objetivo de preservar la función ovárica y de ovulación, en una mujer de 18 años de edad con enfermedad de Hodgkin subdiafragmática que tenía que ser tratada con quimioterapia y radioterapia. El ovario derecho fue trasplantado al espacio celular subcutáneo de la cara interna del brazo derecho y 16 años después, el ovario trasplantado heterotópicamente, continuaba con función endocrina y de maduración folicular (51-52).

En 2004, Hilders y cols. (53) realizaron un autotrasplante heterotópico de ovario con el objetivo de conservar la función ovárica, en una mujer de 29 años con carcinoma cervical que tenía que ser tratada con histerectomía radical más linfadenectomía y radiación pélvica. El ovario izquierdo fue trasplantado heterotópicamente en la región anterior del brazo izquierdo y transposición del ovario derecho a la pared abdominal anterior, durante la histerectomía radical. Un año postrasplante el ovario continuaba con función endocrina y de maduración folicular.

En 2003, Mhatre y cols. (54) reportaron el primer caso de alotrasplante de ovario ortotópico, fue en una paciente de 17 años con síndrome de Turner

(disgenesia ovárica), el ovario donado fue de una donadora viva relacionada (DVR), su hermana de 26 años de edad. En 2005, los mismos autores, (55) informaron de un caso más, la receptora de 15 años con síndrome de Turner, la donadora viva relacionada (DVR), su madre de 38 años de edad y el seguimiento del caso anteriormente reportado (53). En 2006 (56) comunicaron otro caso de alotrasplante ortotópico de ovario en una mujer con falla ovárica prematura y el seguimiento de los tres casos; el primer caso con evolución de tres años, el segundo caso con seguimiento de un año y el tercer caso con evolución durante 9 meses, en los tres casos el ovario ortotópico continuó con función endocrina, de maduración folicular y las pacientes continuaban menstruando. En los tres casos la inmunosupresión se realizó utilizando ciclosporina 4 mg/kg/día y prednisona 0.2 mg/kg/día (dosis de mantenimiento).

### **Trasplante de útero.**

En la literatura médica internacional el trasplante de útero en cirugía experimental se encuentra reportado desde 1918 por Hesselberg (57) en cobayos, desde entonces el trasplante de útero, útero-trompas de Falopio o de útero-salpinges-ovarios se ha efectuado en diversas especies de animales que incluyen cobayo, rata, coneja, oveja, perra, cerda, primate y en la mujer, para investigar la ciclicidad útero-ovárica, rechazo del aloinjerto, preservación, restauración de la fertilidad, etc. (58-63).

En 2000 Fageeh y cols. (59) realizaron el primer trasplante de útero en la mujer con el objetivo de restaurar la fertilidad, la receptora de 26 años de edad, con el antecedente de histerectomía obstétrica 6 años antes y la donadora de 46 años.

La inmunodepresión empleada fue con ciclosporina, azatioprina y prednisolona, el injerto presentó a los 99 días del trasplante trombosis de vasos uterinos, por lo que se realizó histerectomía, no hubo evidencias de pérdida del injerto por rechazo.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La infertilidad se ha considerado como un problema de Salud Pública debido a sus consecuencias médicas, sociales, demográficas y económicas (64). En Estados Unidos de Norteamérica más de 6 millones de mujeres en edad reproductiva presentan infertilidad (65). En México, aproximadamente el 15% de las parejas presentan infertilidad (66, 67). Por otro lado, en 1993, Lunenfeld e Insler (68) estudiando los diagnósticos realizados en 6,540 parejas infértiles por diferentes autores de los cinco continentes, en un periodo mínimo de 4 años, encontraron, en la mayoría de los estudios, al factor tubario como causa de infertilidad; la incidencia de este factor estuvo en un rango de 11.0 al 76.7 % de las parejas estudiadas, mientras que la incidencia del factor endocrino ovárico varió del 10.9 al 49.1 %.

Se ha propuesto al FIV/TE convencional (fertilización *in vitro* y transferencia de embriones a la cavidad uterina) para resolver la infertilidad por daño tubario bilateral irreversible, ausencia quirúrgica de ovarios y/o trompas de Falopio (69), disgenesia gonadal (70) y en pacientes receptoras de trasplante de riñón, hígado, con infertilidad por daño tubario y/o ovárico (71).

Es sorprendente el poco éxito del FIV/TE convencional que se continúa reportando con una tasa global de éxito en Estados Unidos de Norteamérica de 25.6% de nacimientos por ciclo iniciado, con un promedio de 3.1 embriones

transferidos en cada intento. (69) La fertilización *in vitro* continúa siendo un procedimiento excesivamente caro de 7 mil a 11 mil dólares por ciclo y de 67 mil a 114 mil dólares por nacimiento exitoso y por lo mismo limitado a un mínimo de la población infértil, estresante, prolongado, con gran proporción de ciclos cancelados, con una baja tasa de implantación y de embarazo por cada intento, resultando ser una técnica de reproducción asistida invasiva con riesgos y complicaciones incluso mortales para la madre y recién nacido(s). El embarazo múltiple es una de las numerosas complicaciones obstétricas inherentes al procedimiento, otra complicación iatrogénica grave es el síndrome de hiperestimulación ovárica como resultado de la inducción de la ovulación, que puede ser un desorden catastrófico e incluso mortal (72). Existe incremento en el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer como consecuencia directa o indirecta de la estimulación ovárica a través de las punciones ováricas múltiples o de la exposición a elevados niveles estrogénicos, los cánceres más frecuentemente implicados son los epiteliales de ovario y los de mama (73-74).

#### **4. JUSTIFICACIÓN.**

En México, aproximadamente uno de cada siete matrimonios, lo que corresponde a cerca del 15% de las parejas, presenta infertilidad (66). Esta cifra tiende a aumentar por las presiones del mundo, la tendencia a posponer el embarazo por período prolongado, el empleo indiscriminado de técnicas anticonceptivas, así como el aumento de la incidencia de enfermedades de transmisión sexual, entre otros. Por otro lado, durante los últimos 10 años se ha incrementado el interés y la preocupación por el creciente aumento en la

infertilidad, un mayor número de parejas están acudiendo a los servicios médicos para resolver la infertilidad que padecen; también es un hecho que ha aumentado el número de médicos y personal paramédico que se interesa en el estudio de la infertilidad.

La epidemiología de la infertilidad en el Hospital de Gineco-Obstetricia "Luis Castelazo Ayala" de México, D.F, en un estudio realizado, (67) demostró que el factor tubo-peritoneal alterado fue el más frecuente (22.3% de los casos), seguido por el factor endocrino-ovárico (17.6 %).

En la mujer infértil por daño tubario bilateral irreversible, disgenesia gonadal, ausencia quirúrgica de ovarios y/o salpinges o en receptoras de trasplante de órganos (riñón e hígado) con infertilidad por daño tubario y/o ovárico, se ha propuesto como única alternativa terapéutica al FIV/TE convencional.

En los hospitales de Gineco-Obstetricia del Instituto Mexicano del Seguro Social a nivel nacional, no se realiza este procedimiento debido al alto costo económico del equipo de laboratorio y de los medicamentos que requiere la paciente.

Se ha recurrido al uso de modelos experimentales en animales y humanos de trasplante e implante de ovario y/o trompa de Falopio, o de útero con el objetivo de restaurar la función endocrina y/o de fertilidad (37-40, 45-63, 75-97), pero no se conoce modelo experimental de alotrasplante vascularizado tubo-ovárico como "unidad anatómico-funcional" con fines de lograr el embarazo, que permita establecer la técnica quirúrgica experimental ideal, investigar el comportamiento del aloinjerto tubo-ovárico y su expresión clínica e histopatológica.

Nuestro grupo de investigación ha llamado al injerto tubo-ovárico "unidad anatomo-funcional" y hemos trasplantado el ovario con su pedículo vascular de vena y arteria junto con la trompa de Falopio hasta su porción ístmica, reestableciendo la función endocrina y de fertilidad posterior a autotrasplante tubo-ovárico en conejas (94).

El alotrasplante tubo-ovárico como "unidad anatomo-funcional" podría tener aplicación clínica en mujeres con infertilidad causada por el daño tubario bilateral irreversible, disgenesia gonadal, ausencia quirúrgica de ovarios y/o salpinges o como alternativa terapéutica en pacientes que se someten al tratamiento de FIV-TE convencional y no han tenido éxito. La donación tubo-ovárica sería a través de una donadora viva relacionada (DVR) o de una donadora viva no relacionada (DVNR).

En la revisión de informes publicados, no hemos identificado comunicados de alotrasplante tubo-ovárico en la mujer. La experiencia mundial en otros órganos, permite suponer un procedimiento similar en el alotrasplante tubo-ovárico, inicialmente como modelo experimental formal en animales y posteriormente en seres humanos.

## **5. HIPÓTESIS**

El alotrasplante tubo-ovárico ortotópico, con técnica de microcirugía vascular, en la coneja tubo-ovariectomizada, y con la administración de ciclosporina, permite el reestablecimiento de la función endocrina y reproductiva.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo General.

1. Estudiar la función endocrina y reproductiva en conejas tubo-ovariectomizadas con alotrasplante tubo-ovárico ortotópico como “unidad anatomo-funcional”, con técnica de microcirugía vascular y con la administración de ciclosporina.

### Objetivos Particulares

1. Diseñar la técnica microquirúrgica de procuración del aloinjerto tubo-ovárico en la coneja.
2. Diseñar la técnica microquirúrgica del alotrasplante tubo-ovárico ortotópico en la coneja.
3. Determinar las características de la reacción del rechazo en el aloinjerto tubo-ovárico trasplantado, con y sin la administración de ciclosporina.
4. Investigar la viabilidad del aloinjerto tubo-ovárico trasplantado, mediante estudios hormonales ( $E_2$ ,  $P_4$ , FSH y LH) y de fertilidad, así como histopatológicos.

## 7. MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 55 conejas Nueva Zelanda Blancas (NZB), no consanguíneas, con edades entre 7 y 11 meses, de peso entre 3 y 4.5 kg y 6 machos fértiles NZB, procedentes del Bioterio de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México y del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana plantel Xochimilco.

## **A) Grupos de estudio.**

Las conejas se dividieron en 5 grupos experimentales:

**Grupo A.** Donadoras (n=20), se les efectuó salpingooforectomía derecha, que fue el aloinjerto donado (ver figuras 1, 2), seguida de histerectomía mas salpingooforectomía izquierda y eutanasia.

**Grupo 1.** Control (n=10), a las que se les realizó salpingooforectomía izquierda (SOI). Sin la administración de CsA.

**Grupo 2.** Alotrasplante (n=10), se les efectuó salpingooforectomía bilateral (SOB), seguida de alotrasplante tubo-ovárico derecho, ortotópico, sin la administración de CsA (ver figuras 1, 2).

**Grupo 3** Alotrasplante (n=10), se les realizó salpingooforectomía bilateral, seguida de alotrasplante tubo-ovárico derecho, ortotópico (ver figuras 1, 2). A las conejas se les administró CsA 10 mg/kg/día durante los primeros 21 días, para continuar con 5 mg/Kg/día durante el resto del estudio como fármaco inmunodepresor.

**Grupo 4.** Control (n=5), a las que se les realizó salpingooforectomía izquierda y se les administró CsA, mismo esquema que al grupo 3.

## **B) Descripción de la técnica quirúrgica.**

**Coneja donadora. Anestesia.** Se administró atropina 0.2 mg/kg i.m., anestesia general con xilazina 7 mg/kg i.m., ketamina 50 mg/kg i.m. y pentobarbital sódico 45 mg/kg i.v. diluido en 20 ml de solución fisiológica y administrado lentamente (dosis-respuesta), además O<sub>2</sub> con mascarilla facial a 1.5 L./minuto. Se sujetaron las cuatro extremidades a una tabla operatoria, se efectuó tricotomía abdominal,

asepsia, antisepsia y colocación de campos quirúrgicos estériles.

***Procuración del injerto tubo-ovárico derecho (SOD).*** Para el procedimiento quirúrgico se utilizaron dos equipos quirúrgicos cada uno con un microscopio Carl Zeiss OPMI I. Se realizó la apertura de la cavidad abdominal mediante una incisión media longitudinal suprapúbica de aproximadamente 6 cm., se colocó el separador automático abdominal y se efectuó empaquetamiento de asas intestinales con gasas húmedas en solución salina isotónica tibia, para que quedaran expuestos los cuerpos uterinos, salpinges y ovarios, se revisaron los mismos. Se usó electrocoagulador bipolar de Malis, para electrocoagular la arteria y vena úterotubaria a nivel de la unión del cuerno uterino y trompa de Falopio del lado derecho, enseguida se colocaron en el istmo tubario dos ligaduras, la primera proximal al útero con prolene 6-0 y la segunda distal al útero, con una ligadura hecha por nosotros con hule de globo, se seccionó entre ambas ligaduras; se continuó con disección individual de arteria y vena ovárica derechas, distal a la bifurcación de la arteria tubaria y proximal a la aorta para evitar dañar ramas tubarias, se colocó en cada vaso individualmente una ligadura con nylon 8-0 (BV130-4) y se seccionaron ambos vasos y finalmente se efectuó aislamiento de trompa y ovario de sus conexiones peritoneales, extrayendo injerto tubo-ovárico que se colocó en una gasa húmeda y se llevó a un recipiente que contenía solución de perfusión a 4°C y hielo "frappe" de la misma solución (Figuras 1, 2).

Se pasó el injerto al segundo equipo quirúrgico, se finalizó la cirugía en la donadora con histerectomía más salpingooforectomía izquierda para estudio histológico y se procedió a realizar eutanasia de la coneja, con la administración

de 40 mg de pentobarbital sódico, en bolo i.v.

***“Cirugía de banco” y perfusión del injerto tubo-ovárico.***

El 2º. equipo quirúrgico inició "cirugía de banco" con la colocación de catéter intraarterial de silastic de 0.64 mm diámetro externo (Dow Corning), el cual fue fijado con una lazada con nylon 8-0. Enseguida se perfundió el injerto tubo-ovárico de manera gentil y lentamente a través del catéter hasta que el injerto se encontró exangüe, por la vena drenó solución clara y los vasos fueron transparentes. Se perfundió la salpinge a través del istmo con misma solución a 4°C., se colocó un punto con nylon 10-0 (BV100-4) y referencias largas para fácil identificación posterior en el ángulo superior del istmo; enseguida se cortó el tejido periadventicial excedente de la luz venosa con colocación de un punto angular superior con nylon 10-0 y referencia larga para fácil identificación posterior, exéresis del tejido peritoneal y graso excedente ligando con nylon 10-0 los vasos incididos, respetando siempre la integridad de la circulación tubo-ovárica, terminando así "cirugía de banco".

***Coneja receptora. Preparación del sitio anatómico receptor.***

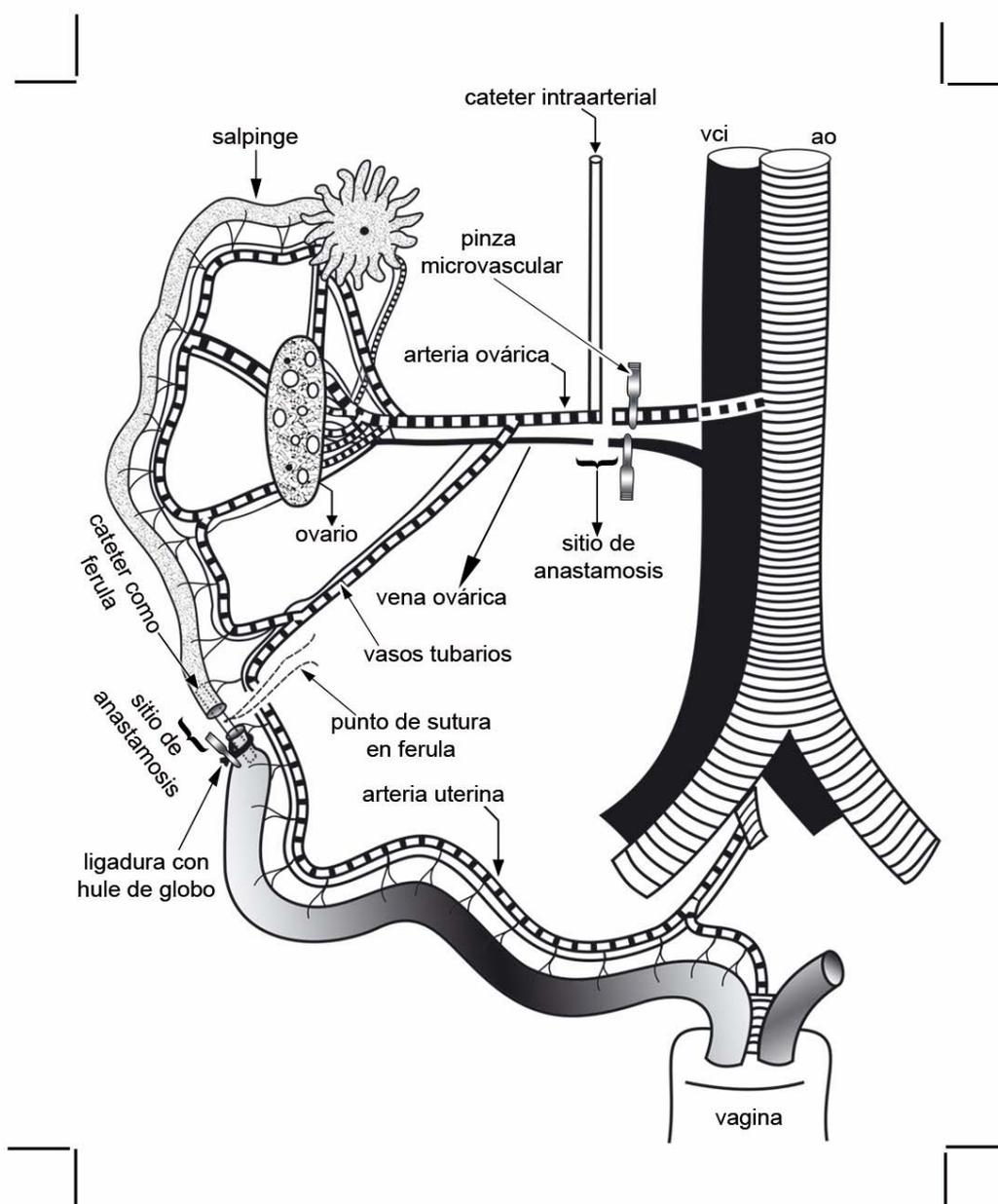
Se realizó la misma preparación que en la coneja donadora, primero se efectuó SOD como describimos anteriormente, excepto que en el istmo tubario, la primera ligadura hecha por nosotros con hule de globo fue colocada proximal al útero y la segunda ligadura con prolene 6-0 se colocó distal al útero. La arteria y vena ovárica receptoras fueron ligadas individualmente con nylon 8-0 y hasta el inicio de la anastomosis venosa, se colocó una pinza vascular exclusivamente en la vena receptora (Figuras 1-3).

***Triple anastomosis.***

El injerto tubo-ovárico junto con el catéter intraarterial y envuelto en una gasa con hielo, se llevó al lugar receptor para ser colocado ortotópicamente del lado derecho, una vez presentado el injerto tubo-ovárico en el área receptora, se efectuó anastomosis tubaria ístmica-ístmica en un plano sin interesar luz tubaria o endosalpinx. De seis a ocho puntos separados con nylon 10-0 fueron necesarios para cada anastomosis, se continuó con la anastomosis venosa término-terminal (t-t), la vena del injerto no fue pinzada, exclusivamente se colocó una pinza microvascular en vena receptora; durante la anastomosis ístmica y venosa, se realizó una perfusión intermitente hipotérmica del injerto con misma solución a 4 grados centígrados a través del catéter intraarterial. De ocho a diez puntos separados con nylon 11-0 (BV50-3) fueron necesarios para cada anastomosis venosa (Figuras 1-4).

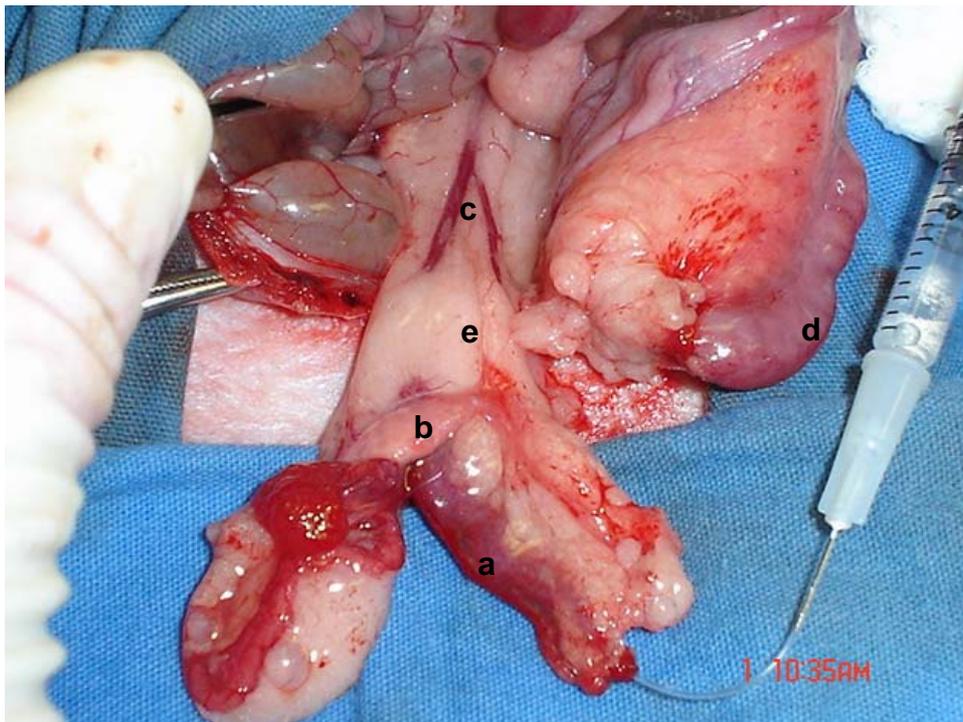
Se finalizó el trasplante con anastomosis arterial, retirando el catéter intraarterial del injerto y la arteria no fue pinzada, solamente se colocó una pinza microvascular en arteria ovárica receptora y la ligadura distal fue retirada. Se efectuó anastomosis arterial término-terminal con nylon 11-0 puntos separados. De ocho a diez puntos fueron necesarios para cada anastomosis arterial; enseguida se realizó SOI, con aislamiento de trompa de Falopio y ovario de sus conexiones peritoneales con electrocoagulación, extrayendo pieza quirúrgica. Se corroboró hemostasia y se retiraron compresas y el separador abdominal; se procedió a colocar solución salina tibia 5 ml para remplazar la pérdida de líquido peritoneal. Se cerró la pared abdominal, peritoneo parietal, aponeurosis y músculo en un plano con vicryl 3-0 súrgete continuo, piel con súrgete continuo usando

nylon 3-0 (PC-5), terminando acto quirúrgico.

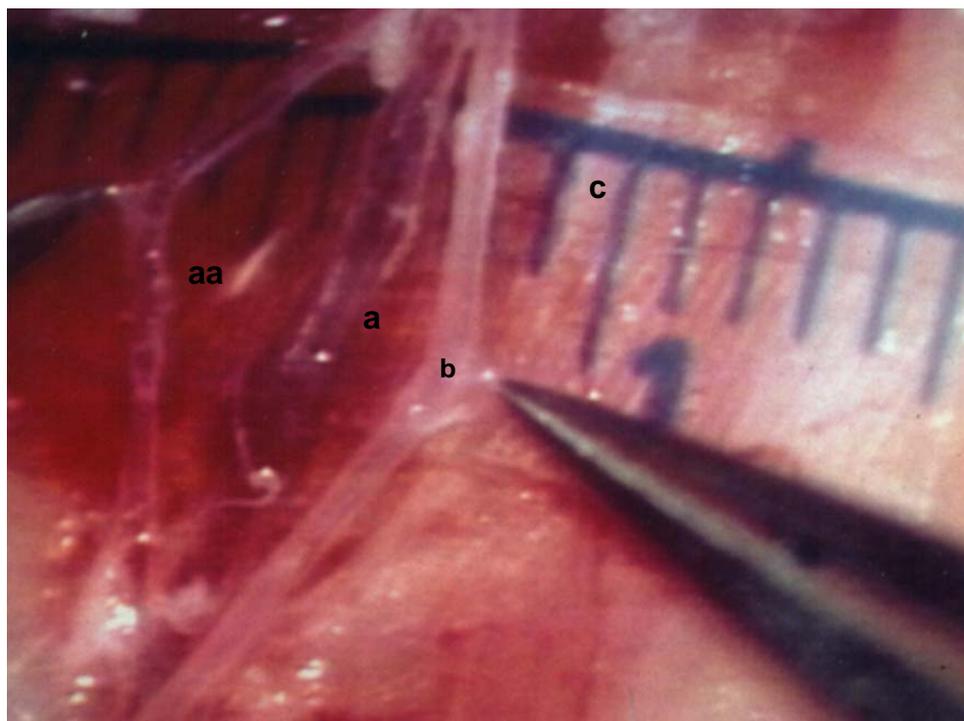


**Figura 1. Injerto tubo-ovárico en la coneja como “Unidad Anatómico-funcional”.** Se señala el catéter intra-arterial, pinzas microvasculares en vasos receptores, catéter intratubario con un punto de referencia para extraerlo previo al final de la anastomosis ístmica, ligadura en istmo receptor con hule de globo y sitios de la triple anastomosis.

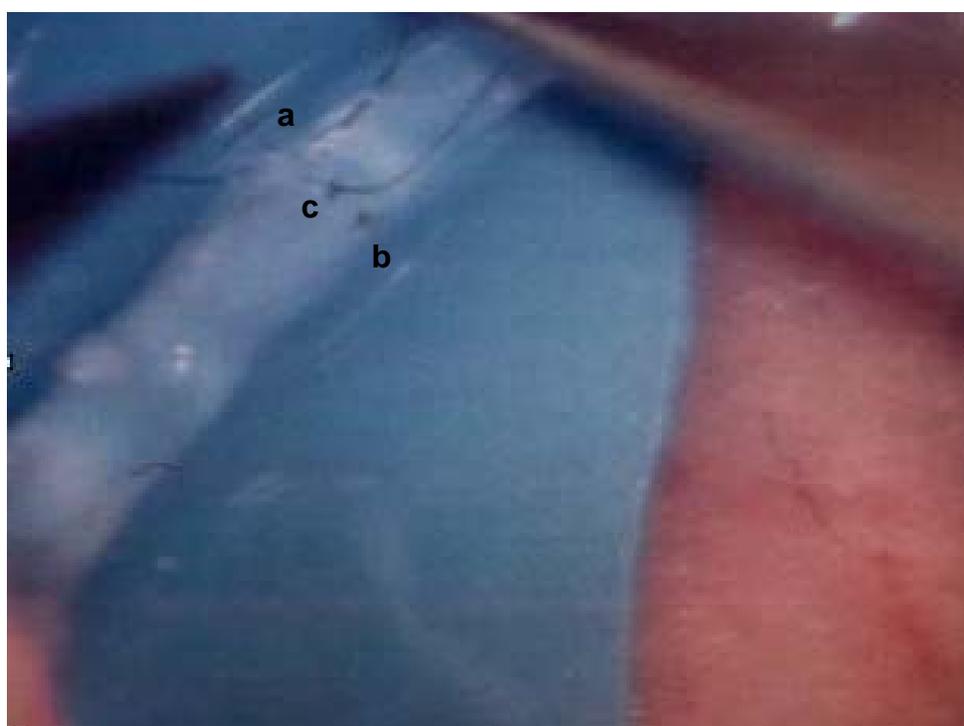
vci= vena cava inferior, ao= arteria aorta



**Figura 2. Procuración del Injerto tubo-ovárico en la donadora.** Se observa trompa de Falopio (a), ovario (b), vasos tubo-ováricos (c), útero (d) y tejido peritoneal-graso (e). Catéter en oviducto para perfusión.



**Figura 3. Disección vasos ováricos.** vena ovárica (a), vena ovárica colateral (aa), arteria ovárica (b), regla milimétrica que señala un mm (c).



**Figura 4. Anastomosis venosa.** Se observa el momento en que se coloca un punto de sutura con nylon 11-0, en un solo tiempo, además se observa la vena distendida, debido a perfusión intermitente durante la anastomosis (a), puntos de sutura (b, c), en la línea de la anastomosis.

***Tiempos quirúrgicos registrados durante el trasplante.***

Durante la cirugía del trasplante registramos el tiempo de isquemia caliente, que se define como el tiempo que transcurrió desde el pinzamiento arterial del injerto tubo-ovárico en la coneja donadora, hasta que el injerto fue colocado en un recipiente conteniendo solución de perfusión a 4°C e hielo "frapo" de la misma solución. El tiempo de isquemia fría, que se define como el tiempo que transcurrió desde el momento anterior hasta la restauración de la circulación con las anastomosis vasculares terminadas.

La solución de perfusión contenía en 250 ml de solución Hartman: 20 mEq. de KCL, 2500 UI de heparina, 5 ml de Xylocaina al 1% y 250 UI de hCG. El tiempo quirúrgico de las anastomosis tubaria, venosa y arterial también se registró y fue el tiempo que transcurrió desde que se inició la anastomosis con la colocación del primer punto de sutura hasta la terminación de la anastomosis con la colocación del último punto.

El tiempo quirúrgico total del trasplante, fue el tiempo total de la cirugía, iniciada en la coneja donadora con la incisión de piel y terminada en la receptora con el último punto de sutura en la herida quirúrgica. El diámetro externo de vasos ováricos y de istmo tubario que fue la medición individual de vena, arteria e istmo tubario en milímetros.

Durante el transoperatorio en todas las cirugías se mantuvo cateterizada una vena periférica en oreja para la administración de medicamentos, soluciones electrolíticas y en el postoperatorio se administró profilaxis antimicrobiana con penicilina procaínica 100 mil UI/kg./día i.m. durante 3 días y como analgésico dipirona 50 mg./kg./día i.m. durante 3 días.

### **C) Evaluación Postoperatoria.**

Se realizó diariamente exploración física general, y se registró el peso de cada coneja en el periodo basal y a las semanas 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> del postoperatorio, ajustando siempre la administración de ciclosporina al peso registrado. La CsA fue diluida en 4 ml de solución glucosada al 20% y administrada directamente en el hocico de la coneja, con catéter de 3 cm. de longitud, por debajo del paladar y por arriba de la lengua.

### **Morbimortalidad.**

Se registraron las complicaciones durante el procedimiento quirúrgico y durante el postoperatorio, así como los hallazgos de la exploración quirúrgica realizada al final del estudio.

### **Apareamiento**

Las conejas fueron colocadas con un macho de probada fertilidad durante 10-15 minutos, los días 29 y 30 del postoperatorio para observar si había apareamiento y gestación subsecuente.

### **D) Determinaciones hormonales**

Se valoró la viabilidad, función y sobrevida del injerto tubo-ovárico, indirectamente a través de determinaciones séricas de estradiol (E<sub>2</sub>), progesterona (P<sub>4</sub>), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH).

Las muestras sanguíneas fueron colectadas de la arteria marginal de la oreja en el preoperatorio (muestras basales) y en el postoperatorio a la 2<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> y

10ª semanas y fueron centrifugadas de inmediato a 3000 rpm durante 10 minutos, el suero obtenido se guardó en congelación a -70°C hasta efectuar las determinaciones hormonales por método de quimioluminiscencia. El mínimo nivel detectable con un grado de confianza del 95% por esta técnica es de 20 pg/mL para E<sub>2</sub>, 0.08 ng/mL para P<sub>4</sub>, 0.2 mUI/mL para FSH y 0.2 mUI/mL para LH (Ver ANEXO 1).

**E) Fertilidad.**

Las conejas que quedaron gestantes se vigilaron durante la gestación. Al nacimiento de las crías y durante las siguientes dos semanas, se determinaron sus características en busca de anomalías congénitas macroscópicas.

**F) Exploración quirúrgica.**

La exploración quirúrgica y eutanasia de las conejas se efectuó a la 10ª semana del postoperatorio. Se describieron las características macroscópicas tubo-ováricas y de úteros. Bajo el microscopio quirúrgico, se buscaron intencionalmente adherencias tubo-ováricas. Para su valoración se empleó la siguiente clasificación: grado 0 ausencia de adherencias, grado + (leve) las adherencias cubrían menos del 25% de la superficie tubo-ovárica; grado ++ (moderado) las adherencias cubrían hasta el 50% de la superficie tubo-ovárica, grado +++ (severo) cuando las adherencias cubrían más del 50% de la superficie tubo-ovárica con o sin involucrar adherencias de otros órganos y/o epiplón. La evaluación de la permeabilidad ístmica, arterial y venosa se realizó con la observación directa del sitio de anastomosis bajo el microscopio.

### **G) Estudio histopatológico.**

La trompa de Falopio, ovario y úteros, se fijaron inmediatamente en formaldehído amortiguado con fosfatos al 10 por ciento. Se procesaron con técnicas convencionales para microscopia de luz y se tiñeron con hematoxilina y eosina para estudio histológico. Se revisó la arquitectura histológica de los úteros, endometrio y del aloinjerto tubo-ovárico, en ovario se determinaron los diferentes estadios del desarrollo folicular, estroma, ovulación, regresión del cuerpo lúteo y en el oviducto se revisaron características del epitelio tubario.

### **8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se utilizó una prueba de MANOVA con un post hoc de Tukey para comparar los cuatro grupos, en las comparaciones de dos en dos se utilizó una prueba de t de Student. En las pruebas de proporciones se utilizó una prueba de X cuadrada. En todas las pruebas se consideró una alfa de 0.05. Se utilizó el programa SPSS versión 13.

### **9. CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

Los animales fueron tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 062-Z00-1999, del manejo de animales de laboratorio (98), siendo operados bajo anestesia general, con técnica quirúrgica estéril, así como la administración de antimicrobianos y analgésicos durante el postoperatorio, para evitar cualquier sufrimiento durante o después del procedimiento quirúrgico.

## 10. RESULTADOS.

### ***Mortalidad y morbilidad.***

En el grupo 1 control, se cuantificaron dos defunciones. La coneja C-1, murió a la 7ª semana del postoperatorio, la causa de la muerte fue gastroenteritis infecciosa con deshidratación, en la necropsia encontramos anexo derecho y úteros sin aparente patología; la coneja C-3, murió el día 24 del postoperatorio, en la necropsia encontramos oclusión intestinal secundaria a Tricobezoar (estómago compactado por pelo y alimento), el anexo derecho se encontró de aspecto macroscópico normal.

En el grupo 3, hubo dos defunciones, la coneja C-1, murió a las 24 horas posterior a la cirugía del trasplante, en la autopsia se encontró como causa de la muerte pulmón izquierdo hemorrágico, secundario iatrogenia durante la introducción del catéter orogástrico a pulmón izquierdo más la administración de 4ml de líquido (CsA diluida en solución glucosada al 20%); el injerto tubo-ovárico se encontró macroscópicamente normal. La segunda muerte fue de la coneja C-6, y ocurrió en el día 31 del postrasplante, durante el postoperatorio presentó pérdida de peso de 1070 g, se encontró en la autopsia el injerto tubo-ovárico de aspecto macroscópico normal y libre de adherencias. La histología del injerto tubo-ovárico y útero sin cambios significativos, concluyendo que murió por inanición.

En el grupo 1, las conejas C-7 y C-8, presentaron dehiscencia parcial de herida quirúrgica, que se resolvieron con curación diaria con isodine. En el grupo 3, la coneja C-3, también presentó dehiscencia parcial y la coneja C-2, cursó con absceso de pared abdominal y dehiscencia total de herida quirúrgica. La primera

se resolvió con curación diaria con isodine, en tanto que la segunda se le administró además enrofloxacin 5 mg/kg/día i.m. durante 5 días y se realizó re-sutura con alambre bajo anestesia general. Las conejas C-9 del grupo 1, C-4 del grupo 2, también presentaron absceso de pared que se resolvió con drenaje, curación diaria y administración de antimicrobiano.

En el grupo 3, las conejas C-7 y C-10, presentaron lesión de intestino delgado, en la primera, al finalizar el trasplante encontramos lesión perforante de aproximadamente 4 mm con salida de contenido intestinal, la cual se reparó en dos planos con puntos separados usando nylon 10-0, evolucionó satisfactoriamente y la segunda al realizar apertura de cavidad peritoneal, lesión de asa intestinal interesando luz, en toda su pared anterior, se reparó en dos planos con nylon 10-0, evolucionó satisfactoriamente.

En el grupo 2, a la coneja C-6, se le realizó una ligadura inadvertida del uréter derecho durante la cirugía del trasplante, evolucionó durante el postoperatorio sin aparentes complicaciones. En el grupo 3, la coneja C-8, presentó textiloma iatrogénico durante la cirugía del trasplante (una gasa en cavidad abdominal), evolucionó el postoperatorio sin aparentes complicaciones.

En las tablas 2 y 3, observamos que el grupo 3 presentó mayor morbilidad que los demás grupos.

**Tabla 2.** Mortalidad y Morbilidad en los 4 grupos.

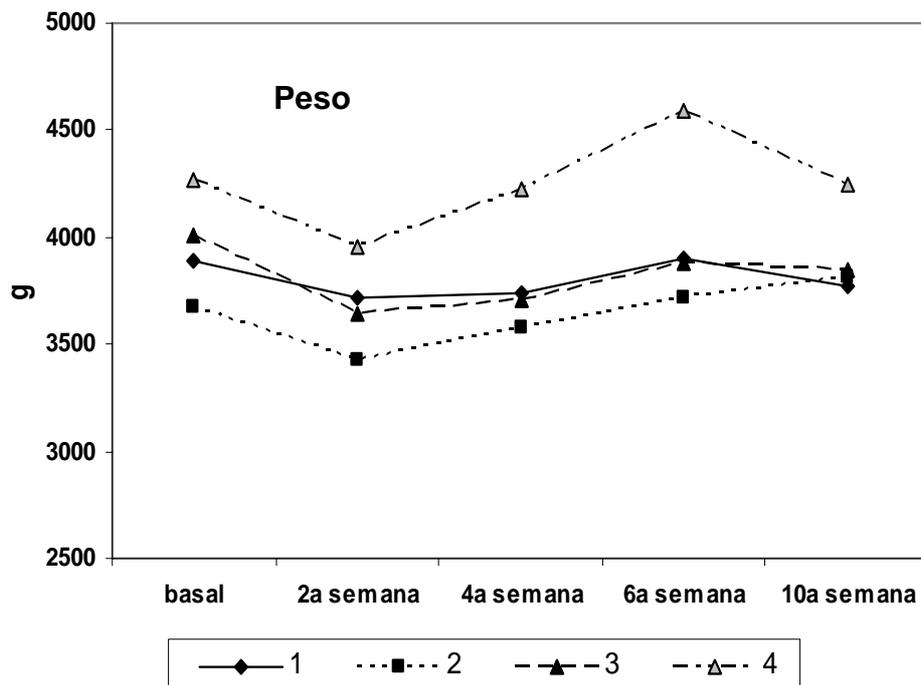
Grupo	Defunción	Dehiscencia herida quirúrgica	Absceso de pared	Lesión intestinal	Ligadura de uréter derecho	Textiloma
<b>Grupo 1 (n=10)</b>	2	2	1	0	0	0
<b>Grupo 2 (n=10)</b>	0	0	1	0	1	0
<b>Grupo 3 (n=10)</b>	2	2	1	2	0	1
<b>Grupo 4 (n=5)</b>	0	0	0	0	0	0

**Tabla 3.** Variables que se observaron durante el desarrollo del experimento en cada uno de los grupos.

Grupo	Coneja	Mortalidad	Morbilidad	Apareamiento	Gestación	No. crías	Rechazo	Grado de adherencias
1 SOI sin CsA	1	Defunción						
	2			Positivo	Positiva	5		0
	3	Defunción						
	4		Patología tubaria	Positivo	Pseudoembarazo			II
	5			Positivo	Positiva	2		I
	6			Positivo	Positiva	4		0
	7		Dehiscencia parcial de herida Qx	Positivo	Positiva	5		0
	8		Dehiscencia parcial de herida Qx	Positivo	Positiva	6		0
	9		Absceso de pared abdominal	Positivo	Positiva	3		0
	10			Positivo	Positiva	4		0
2 Alotrasplante sin CsA	1			Negativo	Negativa		sí	II
	2			Negativo	Negativa		sí	III
	3			Positivo	Negativa		sí	II
	4		Absceso de pared abdominal	Negativo	Negativa		sí	III
	5			Positivo	Negativa		sí	II
	6		Ligadura de uréter derecho	Negativo	Negativa		sí	III
	7			Positivo	Negativa		sí	III
	8			Negativo	Negativa		sí	III
	9			Negativo	Negativa		sí	II
	10			Negativo	Negativa		sí	III
3 Alotrasplante con CsA	1	Defunción						
	2		Absceso de pared abdominal y dehiscencia total de herida Qx	Positivo	Pseudoembarazo		no	0
	3		Dehiscencia parcial de herida Qx	Negativo	Negativa		sí	III
	4			Positivo	Positiva	1	no	0
	5			Positivo	Negativa		sí	I
	6	Defunción						
	7		Lesión perforante de asa intestinal	Negativo	Negativa		sí	III
	8		Gasa (Textiloma)	Positivo	Pseudoembarazo		no	III
	9			Positivo	Negativa		sí	II
	10		Lesión perforante de asa intestinal	Negativo	Negativa		sí	III
4 SOI con CsA	1			Positivo	Positiva	2		0
	2			Positivo	Positiva	3		0
	3			Positivo	Positiva	4		0
	4			Positivo	Positiva	2		I
	5			Positivo	Positiva	3		0

### Peso Corporal.

El registro del peso, en las conejas, de cada uno de los grupos, en los diferentes tiempos se muestra en la Figura 5. Obsérvese que el peso de las conejas del grupo 4 fue mayor que el de las conejas de los grupos 1, 2 y 3 ( $p < 0.05$ ), es probable que fue debido a que este grupo 4, no presentó complicaciones durante el transoperatorio, ni durante el postoperatorio.



**Figura 5.** Comparación de los pesos de los 4 grupos estudiados.

### Evaluación de la cirugía.

Se efectuaron un total de veinte anastomosis tubarias ístmica-ístmica con una permeabilidad inmediata del 100% y permeabilidad tardía del 15%. Se realizaron un total de 40 anastomosis vasculares, en dos de los trasplantes se tuvo dificultad técnica durante la disección de la arteria y/o vena ovárica receptora, debido a variabilidad anatómica de vasos, con dos y tres arterias o

venas colaterales, resultando la anastomosis venosa o arterial entre vasos de menor calibre y con mayor dificultad técnica, con trombosis venosa en dos casos y arterial en uno al retirar pinza vascular, con una permeabilidad inmediata del 92.5% y con una permeabilidad tardía 16.6%. El diámetro interno del istmo tubario en las conejas donadoras y receptoras tuvo una media de 1.04 mm EE 0.03 mm, el diámetro externo con una media de 2.18 mm EE 0.04 mm, el diámetro externo de la vena tuvo una media de 0.89 mm EE 0.03 mm y la media de la arteria fue de 0.72 mm EE 0.03 mm.

#### Tiempos de isquemia.

En los grupos 2 y 3, durante el tiempo de isquemia caliente, no hay diferencia significativa, mientras que el tiempo de isquemia fría fue menor en el grupo 2,  $p = < 0.05$  (Tabla 4).

**Tabla 4.** Tiempos de isquemia en los grupos de alotrasplante tubo-ovárico.

Grupo	Tiempo de isquemia	
	Caliente (segundos)	Fría (minutos)
2	126.0 ± 2.6	105.1 ± 2.2
3	122.6 ± 3.0	119 ± 2.2 *

Los resultados se expresan en media ± error estándar. \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo 2

### Tiempo de anastomosis.

La Tabla 5 muestra los diferentes tiempos, en realizar las anastomosis ístmica, venosa y arterial. Podemos observar que no hay diferencias significativas entre los grupos 2 y 3,  $p > 0.05$

**Tabla 5.** Tiempo de triple anastomosis.

Grupo	Tiempo de anastomosis en minutos		
	Ístmica	Venosa	Arterial
2	13.0 ± 0.54	16.0 ± 0.47	14.0 ± 0.47
3	12.7 ± 0.50	17.0 ± 0.37	13.5 ± 0.43

Los resultados se expresan en media ± error estándar.

### Tiempo quirúrgico del trasplante.

En la Tabla 6 se compara el tiempo quirúrgico en la donadora, en la receptora y tiempo quirúrgico total del trasplante en los grupos 2 y 3. Se observa diferencia significativa entre los dos grupos. El mayor tiempo quirúrgico en el grupo 3 fue por que hubo más conejas con complicaciones transoperatorias.

**Tabla 6.** Tiempo quirúrgico del trasplante.

Grupo	Tiempo quirúrgico en minutos		
	Donadora	Receptora	Total
2	42.6 ± 2.6	139.1 ± 2.6	181.7 ± 3.9
3	52.5 ± 2.1 *	149.7 ± 3.6 *	202.2 ± 2.7 *

Se encuentran diferencias significativas \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo 2. Los resultados se expresan en media ± error estándar.

### Fertilidad.

En el grupo 1 control (SOI sin CsA), solamente una coneja (C-4) no quedó gestante cursó con pseudoembarazo clínico, niveles séricos hormonales sugestivos de ovulación, en la exploración quirúrgica en la eutanasia encontramos a nivel de la fimbria tubaria múltiples quistes milimétricos paratubarios que pudieron haber interferido en la captura ovular durante la ovulación y en consecuencia no quedar gestante.

En el grupo 2 (alotrasplante sin CsA), ninguna coneja quedó gestante, en todas se presentó rechazo inmunológico al aloinjerto documentado por el estudio histológico.

En el grupo 3 (alotrasplante con CsA), cinco conejas presentaron rechazo y tres restantes no lo presentaron, de estas sólo una (C-4), quedó gestante, pariendo una cría macroscópicamente normal. Las otras dos conejas (C-2 y C-8) con ausencia de rechazo que no quedaron gestantes, la primera fue la coneja que cursó con absceso de pared y dehiscencia total de herida quirúrgica que requirió

re-sutura, durante el apareamiento hubo recepción del macho y durante la exploración quirúrgica al final del estudio se encontró el injerto tubo-ovárico de apariencia macroscópica normal y libre de adherencias. No podemos explicar por qué no quedó gestante. En la segunda coneja en la exploración quirúrgica al final del estudio, encontramos un textiloma (gasa) con proceso adherencial que involucraba injerto tubo-ovárico con asas intestinales. Los niveles séricos de hormonas en las dos conejas fueron sugestivos de ovulación, cursando además con pseudoembarazo clínico.

En el grupo 4 control (SOI con CsA), las cinco conejas quedaron gestantes, cursando el embarazo sin aparentes complicaciones, las crías al ser exploradas, no presentaron malformaciones congénitas. La receptividad de las conejas durante el apareamiento, las conejas gestantes, la duración de la gestación y el número de crías en cada grupo se muestran en las Tablas 7 y 8. Durante el apareamiento, observamos que la hembra receptiva, acepto al macho en la monta y el macho al terminar la eyaculación, presentó una característica “caída” lateral. La coneja que no fue receptiva, la monta del macho no ocurrió. En la tabla 7 se puede observar que los cuatro grupos tienen comportamiento diferente entre si,  $p < 0.05$ . El pseudoembarazo se caracterizó por que durante la semana previa a la fecha probable de parto, la coneja “tira” mucho pelo, para hacer su nido.

En la tabla 8, se observa claramente que en los grupo 1 y 4 (grupos control) el número de conejas gestantes es mayor ( $p < 0.05$ ). La duración de la gestación fue similar en los grupos 1, 3 y 4.

En la exploración física que se realizó diariamente, a cada una de las crías, de los grupos 1, 3 y 4, durante dos semanas, no se encontraron malformaciones

congénitas en ningún caso.

**Tabla 7.** Conejas receptoras durante el apareamiento.

Grupo	Receptiva	No receptiva	Pseudo-embarazo	Total
1	8 (100%)	0 (0%)	1 (10%)	8
2	3 (30%)	7 (70%)	0 (0%)	10
3	5 (62.5%)	3 (37.5%)	2 (25%)	8
4	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	5

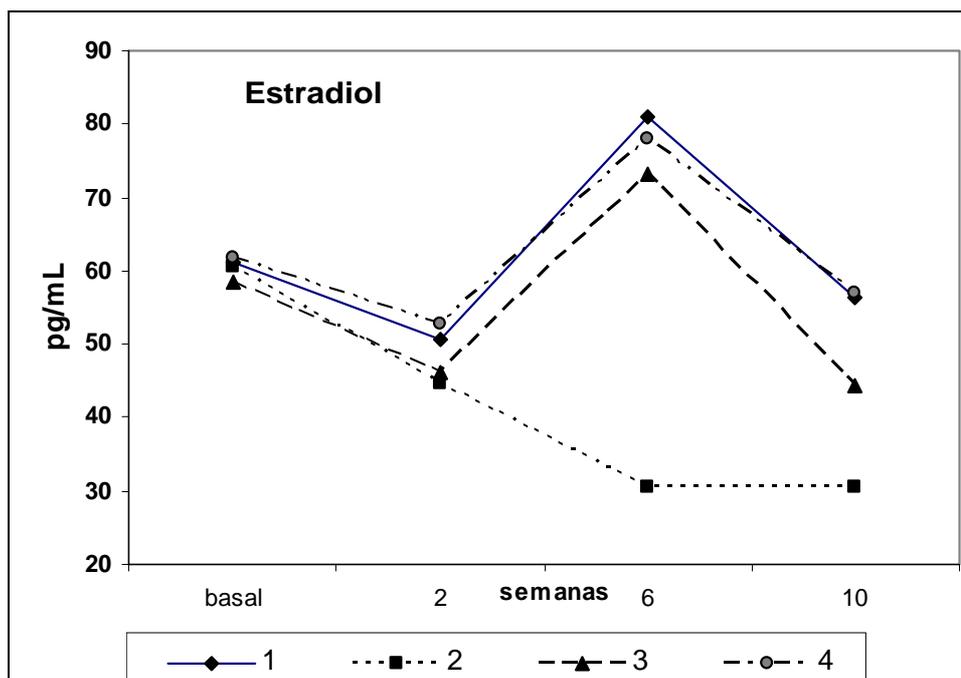
**Tabla 8.** Conejas gestantes, duración de la gestación y número de crías en los 4 grupos.

Grupo	Gestante	No gestante	Tiempo de gestación (días)	Número de Crías	Total
1	7(87.5%)	1(12.5%)	32.7	4.1	8
2	0 (0%)	10 (100%)	0	0	10
3	1 (12,5%)	7 (87.5%)	31	1	8
4	5 (100%)	0 (0%)	31	2.8	5

### **Niveles hormonales.**

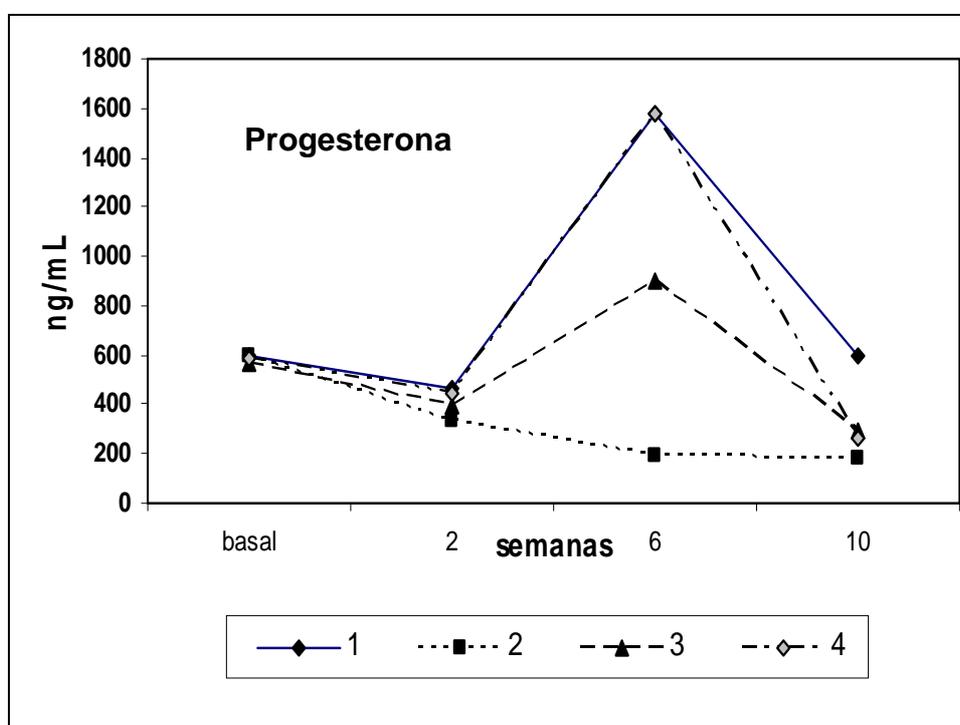
Los niveles séricos de estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ), hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), de los grupos 1, 2, 3 y 4, en el periodo basal, 2<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, y 10<sup>a</sup> semana del estudio, se muestran en las Figuras 6-9.

**Estradiol.** Durante la 2<sup>a</sup> semana del postoperatorio, hay una caída en los niveles séricos de estradiol en todos los grupos. En la 6<sup>a</sup> semana, que corresponde a la segunda semana de gestación, los niveles séricos de estradiol presentan un incremento en los grupos 1, 3 y 4, pero el grupo 2, presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ); finalmente en la semana 10<sup>a</sup>, que corresponde a la 2<sup>a</sup> semana del posparto, los niveles séricos de estradiol, en todos los grupos, presentan un descenso, con respecto a la medición anterior, excepto en el grupo 2, que permanecen bajos ( $p < 0.05$ ). Obsérvese que el grupo 2 es el que marca la diferencia con los demás grupos ( $p < 0.05$ ) y correspondió al grupo en el cual, todas las conejas presentaron rechazo. Figura 6.



**Figura 6.** Niveles séricos de estradiol en las conejas de los 4 grupos. Obsérvese que el grupo 2 presenta una caída en los niveles de estradiol a partir de la semana 2 ( $p < 0.05$ ).

**Progesterona.** Durante la 2ª semana del postoperatorio, la caída en los niveles séricos de progesterona, es similar en los 4 grupos; en la 6ª semana, que corresponde a la 2ª semana de gestación, los niveles séricos de progesterona, aumentaron en los grupos 1 y 4 (grupos controles), siendo el incremento menor en el grupo 3 ( $p < 0.05$ ); finalmente en la semana 10ª, que corresponde a la 2ª semana del posparto, los niveles séricos de progesterona, en los grupos 1, 3 y 4, presentan un descenso. Obsérvese que el grupo 2 es el que marca la diferencia con los demás grupos ( $p < 0.05$ ) y correspondió al grupo en el cual, todas las conejas presentaron rechazo. Figura 7.

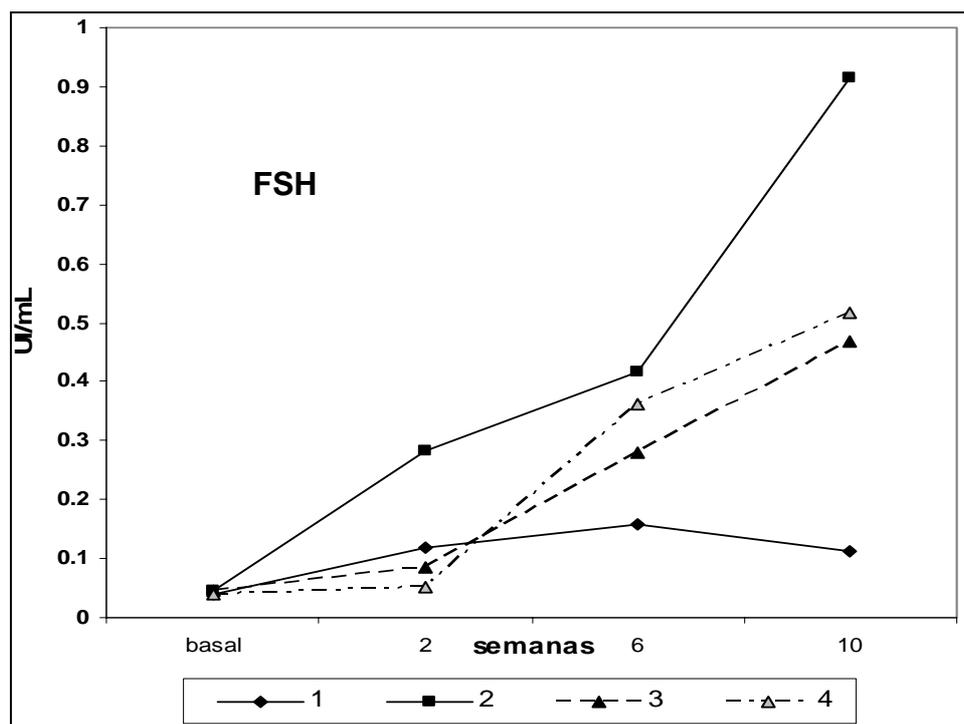


**Figura 7.** Niveles sérico de progesterona en los 4 grupos de conejas. En el grupo 2 y 3 se observa una concentración menor

comparados con los grupos 1 y 4 ( $p < 0.05$ ).

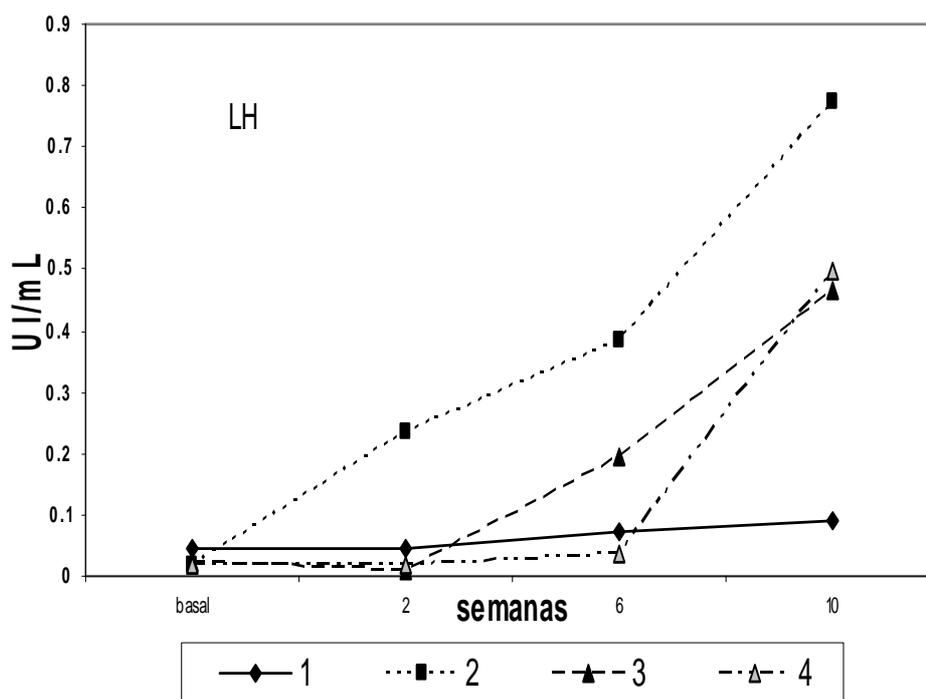
**Hormona folículo estimulante.** En el grupo 2, el cual todas las conejas presentaron rechazo, observamos que los niveles séricos de FSH, permanecen más altos, que en el resto de los grupos, siendo significativa esta diferencia solo en la semana 10<sup>a</sup> ( $p < 0.05$ ). Los grupos 3 y 4, presentaron un comportamiento similar durante todo el estudio. En comparación, el grupo 1, en la semana 6<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> permanece con niveles bajos ( $p < 0.05$ ), que el resto de los grupos. Obsérvese que el grupo 2 es el que marca la diferencia con los demás grupos ( $p < 0.05$ ).

Figura 8.



**Figura 8.** Niveles séricos de FSH en los cuatro grupos de conejas. Las concentraciones del grupo 2 se mantienen por arriba de los demás grupos en la semana 2 y 10 ( $p < 0.05$ ).

**Hormona luteinizante.** En el grupo 2, en el que todas las conejas presentaron rechazo, observamos un incremento en los niveles séricos de LH, a partir de la 2ª semana, siendo más pronunciados en la semana 10ª ( $p < 0.05$ ). Los grupos 3 y 4, presentaron un comportamiento similar durante las semanas 2ª y 10ª, observándose una elevación en ambos grupos, sólo en la semana 10ª ( $p < 0.05$ ); sin embargo el grupo 1, permanece similar al grupo 3 y 4, excepto en la semana 10ª, donde los niveles permanecen bajos ( $p < 0.05$ ). Obsérvese que el grupo 2 es el que marca la diferencia con los demás grupos ( $p < 0.05$ ) y correspondió al grupo en el cual, todas las conejas presentaron rechazo. Figura 9.



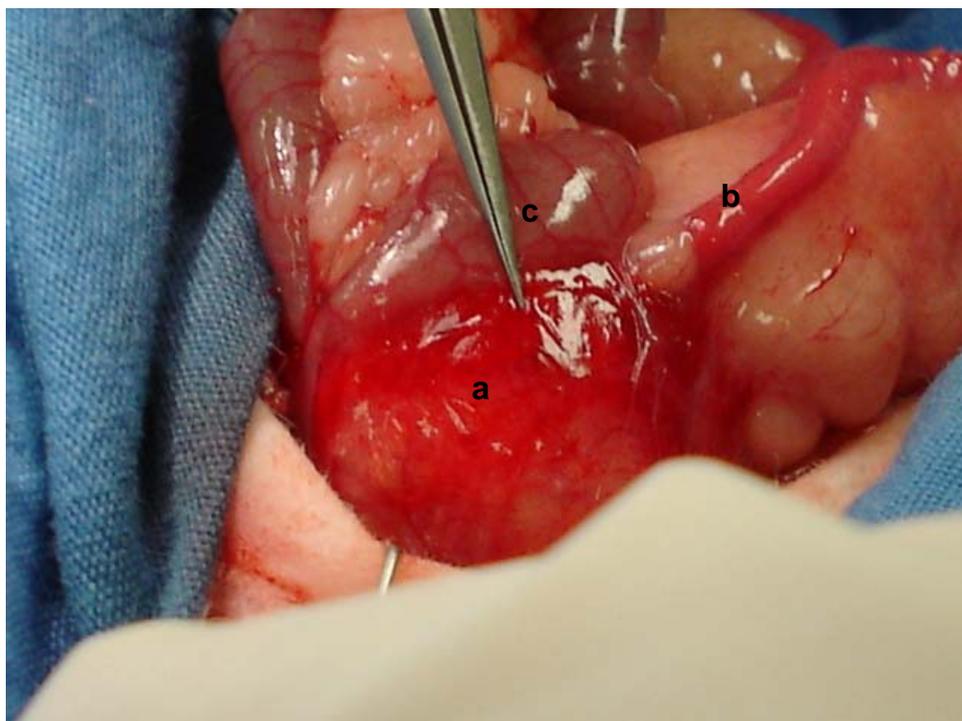
**Figura 9.** Niveles séricos de LH en los cuatro grupos del estudio. El grupo 2 mantiene niveles séricos de LH superiores al grupo 1 en las semanas 2, 6 y 10 ( $p < 0.05$ ).

### ***Exploración quirúrgica y eutanasia.***

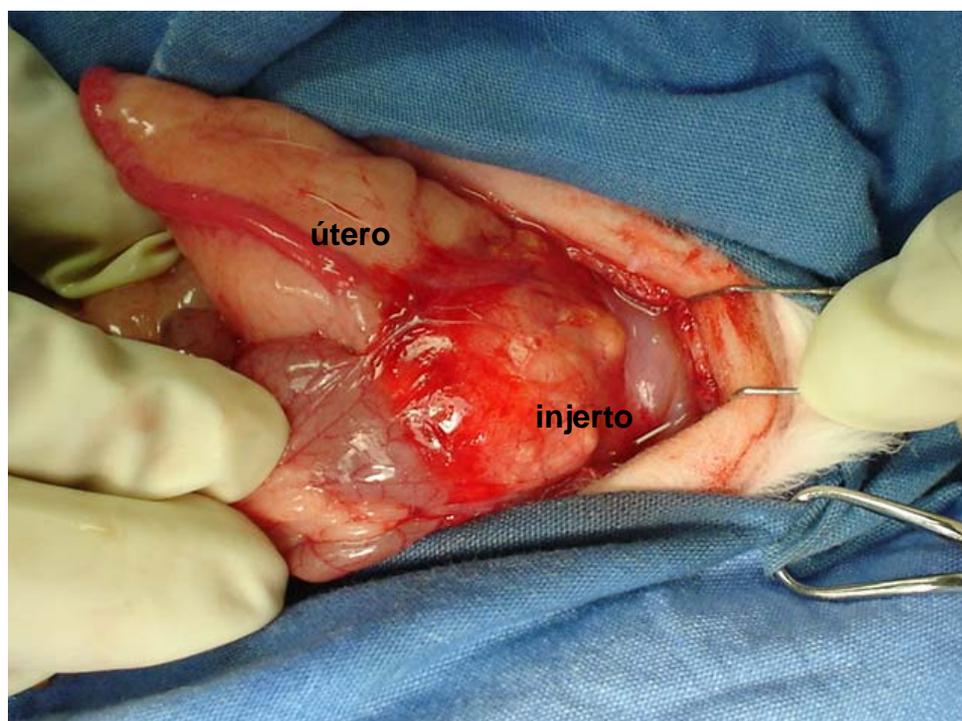
En la exploración quirúrgica al final del estudio en cada coneja, se realizó a la 10ª semana del postoperatorio, en el grupo 1 (control, SOI sin la administración de CsA), hubo 2 casos con adherencias, en el grupo 4 (control, SOI con la administración de CsA), se presentó un solo caso con adherencias, en los 3 casos, de ambos grupos, las adherencias se presentaron, en el muñón del anexo extirpado, involucrando epiplón en dos casos y asa intestinal en un caso, posiblemente por hemostasia insuficiente y manipulación excesiva, durante la disección y exéresis del anexo. En el grupo 2 (alotrasplante sin la administración de CsA), en todos los casos se encontraron adherencias, 4 casos con grado II y 6 casos con grado III. En el grupo 3 (alotrasplante con la administración de CsA), hubo 2 casos con ausencia de adherencias, un caso con adherencias grado I, un caso con adherencias grado II y 4 casos con adherencias grado III.

Los aloinjertos tubo-ováricos viables fueron identificados por conservar su tamaño normal, color rosa brillante, se observó la presencia de folículos en la superficie del ovario, libre de adherencias, los úteros de tamaño normal y de color rojo brillante. Los injertos con rechazo se caracterizaron por encontrarse encapsulados no identificables, con fibrosis en su superficie, de color amarillento, consistencia firme, algunos con adherencias que involucraban úteros, fondo de saco vaginal posterior, vejiga o asas intestinales, otros con hinchazón, tumefacción o edema, de color gris oscuro con presencia de hemorragia, manchas necróticas en la superficie del ovario o necrosis extensa. La reducción del tamaño o encogimiento y palidez fueron características de la hipotrofia

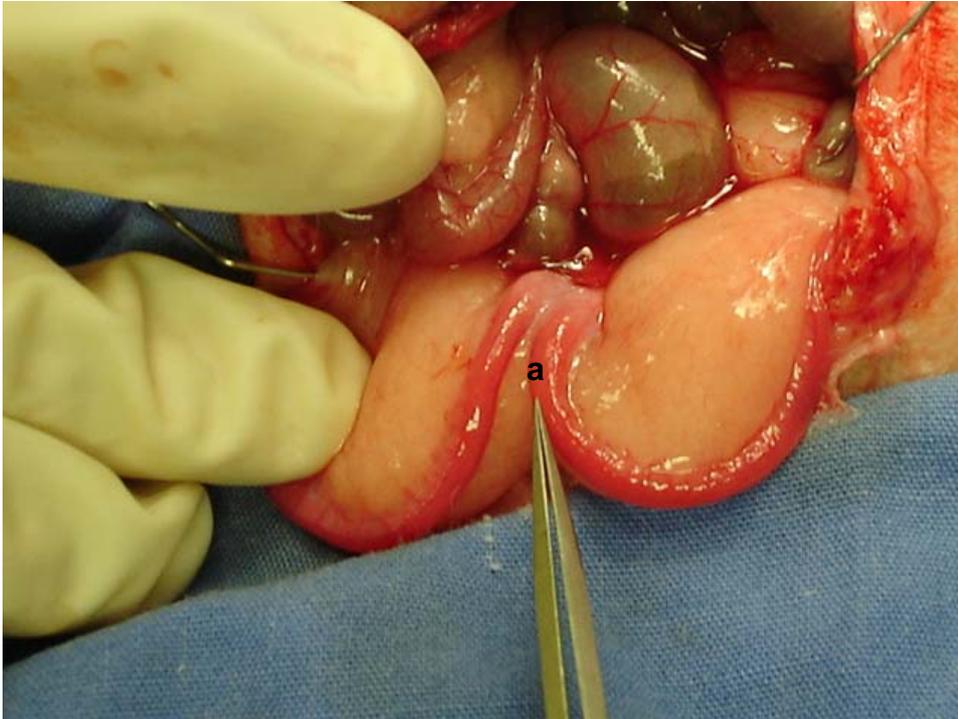
(Figuras 10-12).



**Figura 10. Rechazo del aloinjerto tubo-ovárico.** La pinza señala el encapsulamiento del aloinjerto (a), útero hipotrófico (b) y adherencia de una asa intestinal (c).



**Figura 11. Rechazo del aloinjerto tubo-ovárico.** Se observa el útero hipotrófico y el encapsulamiento del aloinjerto y adherencia de un asa intestinal.



**Figura 12. Rechazo del aloinjerto tubo-ovárico.** a) Se observa los dos úteros con hipotrofia.

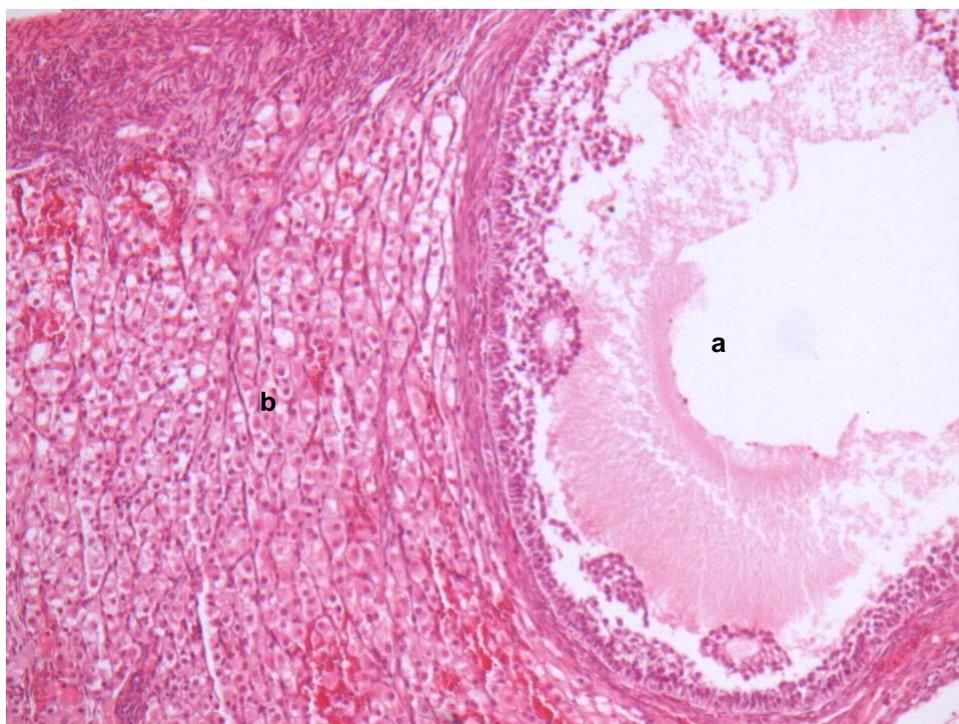
### **Estudio histológico.**

En las conejas de los grupos control 1 y 4, el estudio histológico de los ovarios, oviductos y úteros, no mostraron cambios significativos.

En las conejas del grupo 2 (sin la administración de CsA) y en cinco conejas del grupo 3 (con la administración de CsA), que presentaron rechazo, en el estudio histológico el ovario con rechazo, así como el oviducto, se caracterizó por presentar en proporciones variables: necrosis coagulativa difusa, hemorragia, agregados de células inflamatorias principalmente macrófagos epitelioides, infiltrado linfocitario, cambios degenerativos en los folículos, proliferación de tejido conectivo fibroso, depósitos multifocales de material

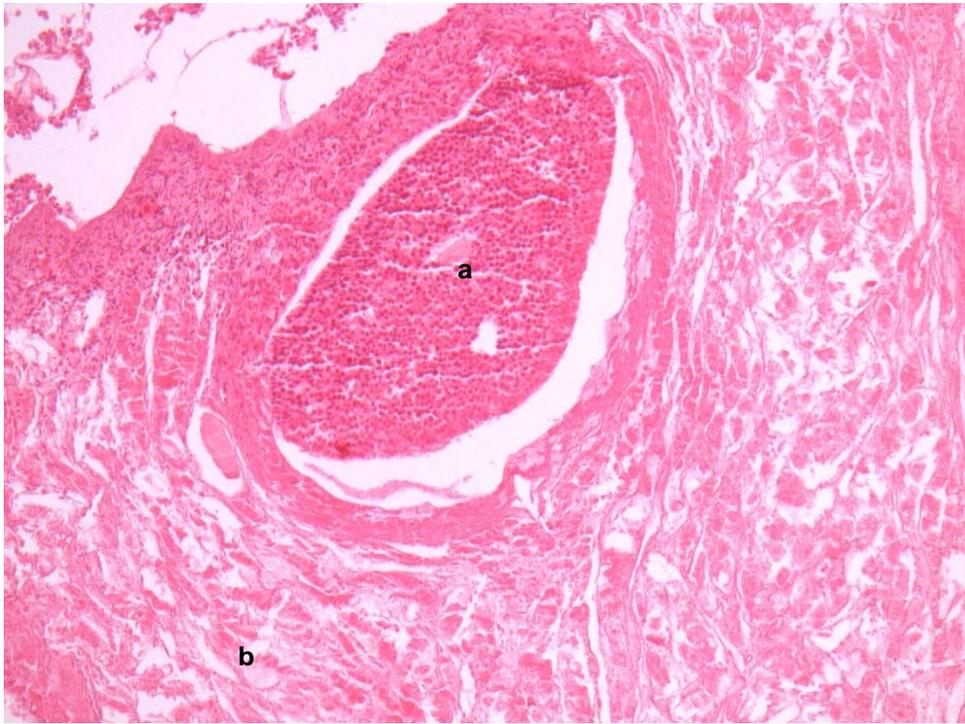
granular basofílico y material extraño refringente, engrosamiento de pared de vasos sanguíneos con trombosis vascular y tejido necrótico esparcido, la grasa periférica del ovario con áreas de necrosis, inflamación granulomatosa y fibrosis; además el oviducto presentó esclerosis de su pared. Los úteros presentaron disminución del espesor del endometrio y del número de glándulas endometriales (hipotrofia) con hemorragias multifocales en el estroma endometrial (Figuras 13-18).

En el estudio histológico, en los tres casos sin rechazo del grupo 3, en el ovario se encontró solo escasa infiltración linfocítica o de células plasmáticas y el estroma mostró apariencia normal, con desarrollo folicular en diferentes estadios y cuerpos blancos; la salpínges con epitelio normal y el útero con endometrio glandular normal.

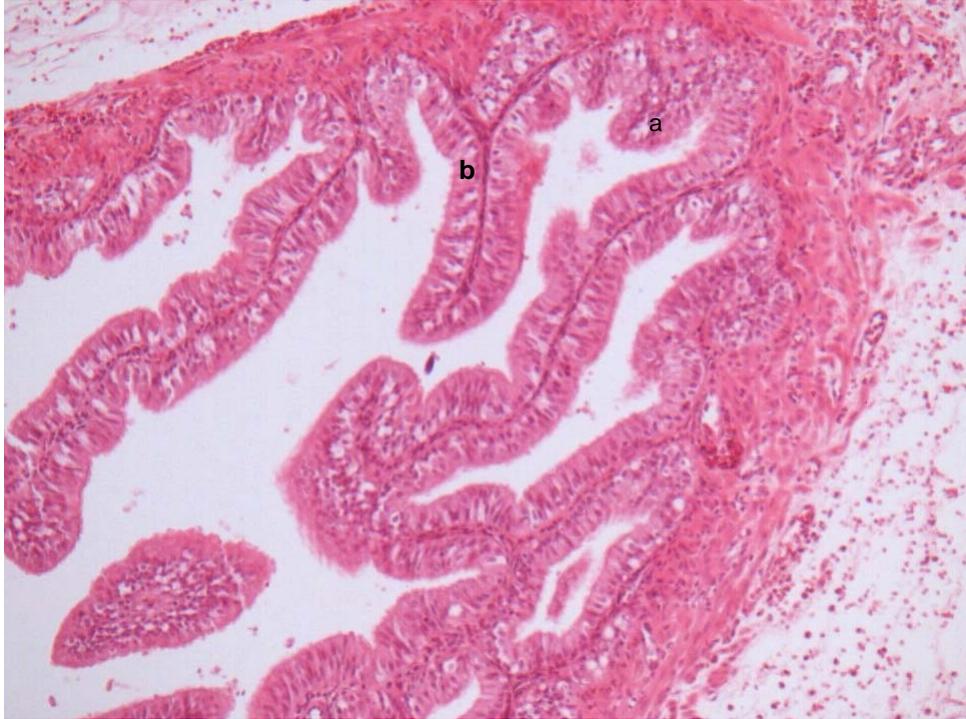


**Figura 13.** Corte histológico de ovario de coneja sin rechazo inmunológico.

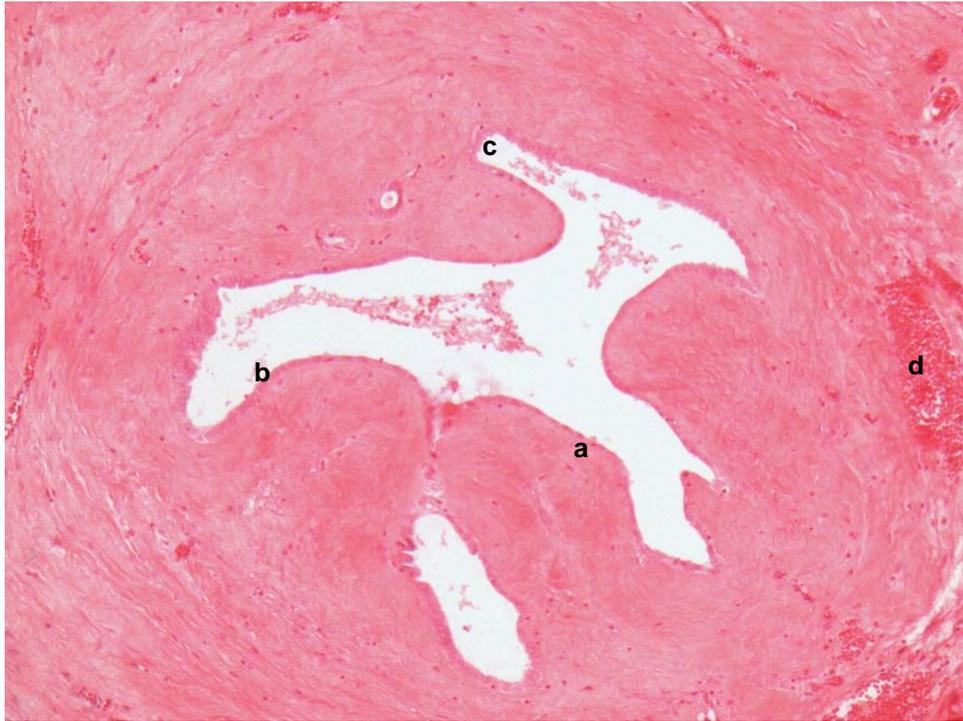
Se observa un folículo maduro del lado derecho (a) y estroma ovárico normal (b) del lado izquierdo. HE; 100 X.



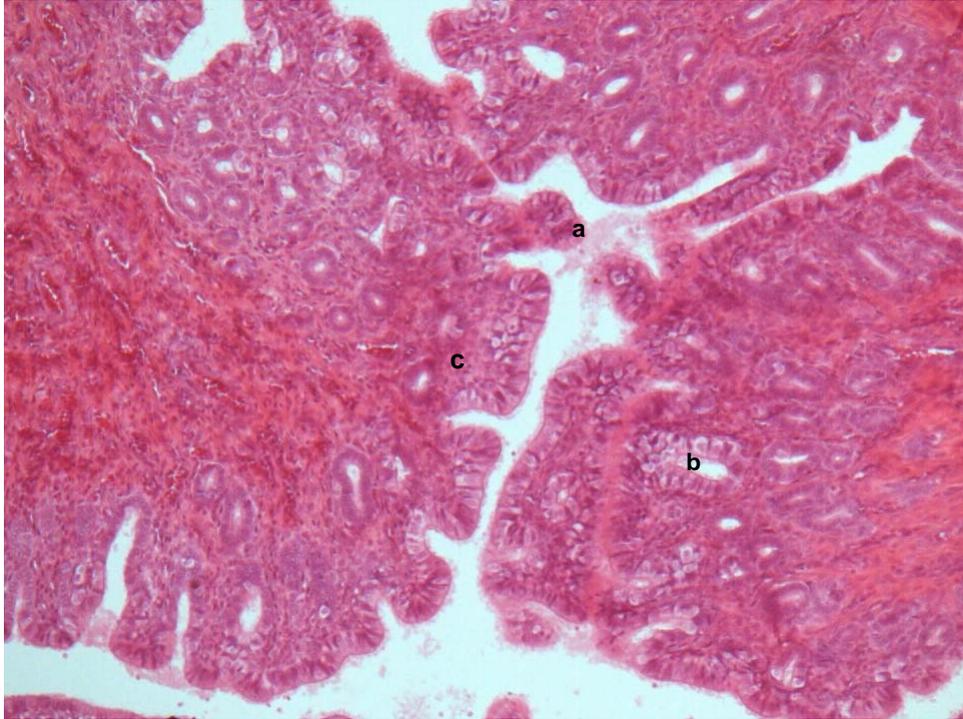
**Figura 14.** Corte histológico de ovario de coneja con rechazo inmunológico. Se distingue un folículo (a) lleno de restos celulares (detritos). El estroma circundante (b) exhibe necrosis coagulativa caracterizada por marcada eosinofilia y cariolisis de las células estromales; sin embargo, la arquitectura tisular aun es reconocible. HE; 100 X.



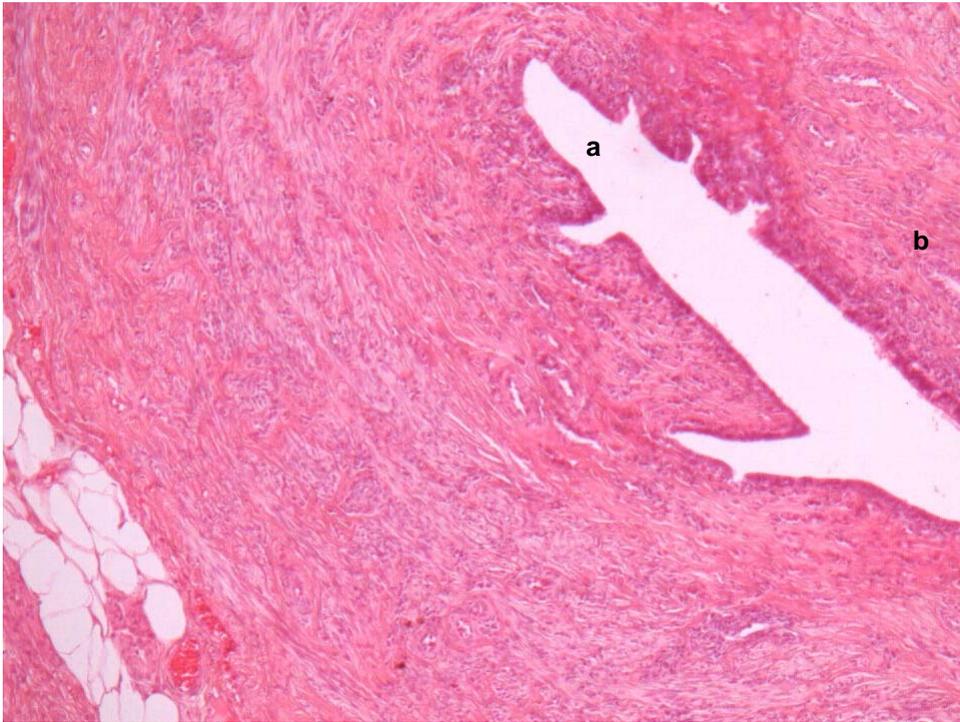
**Figura 15.** Corte histológico de oviducto de coneja intacto (sin rechazo inmunológico). Se observa en todo el corte pliegues de la mucosa (a) sostenidos por escaso tejido fibrovascular y revestidos por un epitelio columnar pseudoestratificado con células ciliadas y no ciliadas (b). HE; 100 X.



**Figura 16.** Corte histológico de oviducto de coneja con rechazo inmunológico. La pared del oviducto, incluyendo la lámina propia de la mucosa están expandidos por la presencia de abundante tejido conectivo rico en colágena hialina (esclerosis) (a). En la mucosa, el epitelio de revestimiento exhibe hipereosinofilia y exfoliación parcial. c) Los pliegues son cortos, amplios (b) y en ocasiones están fusionados. En la periferia se aprecian focos de hemorragia de tamaño variable (d). HE; 100 X).



**Figura 17.** Útero de coneja con aloinjerto sin rechazo inmunológico. Se observan varios pliegues endometriales que se proyectan hacia la luz del órgano (a). El epitelio superficial (b) es columnar simple y las glándulas endometriales están revestidas por un epitelio columnar alto con núcleos basales. El estroma endometrial (c) es muy celular y ricamente vascularizado. HE; 100 X.



**Figura 18.** Útero de coneja con aloinjerto de ovario y rechazo inmunológico. La luz del cuerno uterino esta reducido de tamaño (hipotrófico) (a), el endometrio (b) exhibe escaso estroma, glándulas y pliegues. HE; 40 X.

## 11. DISCUSION.

El trasplante de ovario, de trompa Falopio y de útero, con el objetivo de restablecer la fertilidad y/o la función endocrino ovárica, ha sido realizado en diferentes especies de animales como cobayo, hámster, rata, coneja, perra, oveja, cerda, primate y en la mujer (37-40, 45-63, 75-97). En la mujer se ha trasplantado la trompa de Falopio, en 21 casos, con el objetivo de restablecer la fertilidad, sin haber tenido éxito. En ocasiones se han obtenido de la donadora viva, la trompa de Falopio y el ovario, para trasplantar la trompa de Falopio y desechar el ovario (39, 46, 48).

El trasplante de trompa de Falopio o de ovario, de manera aislada, tiene el inconveniente de cortar las relaciones anatómicas existentes entre el oviducto y el ovario, como es la delicada y abundante microcirculación fimbrio-ovárica, además se interrumpe la integridad anatómica y vascular a través del mesosalpinx y mesovario, lo que afecta la función óptima del oviducto durante la ovulación.

Otros autores, para facilitar la técnica quirúrgica y simplificar el trasplante, han realizado en hámster, rata y coneja, el trasplante de útero, oviducto y ovario (61, 79, 82, 83) con el objetivo de restablecer la fertilidad, estos investigadores han propuesto resolver el problema de infertilidad por daño tubario y/u ovárico irreversible, utilizando el alotrasplante tubario y/o de ovario.

Nosotros trasplantamos la trompa de Falopio y el ovario, juntos, como “unidad anatomo-funcional”, con lo que mantuvimos íntegra la relación fimbrio-ovárica, no interfiriendo con la captura ovular por la fimbria tubaria durante la ovulación, obtuvimos una coneja gestante del grupo 3 (alotrasplante con la administración de CsA), en este grupo, tres conejas no presentaron rechazo.

Demostramos el restablecimiento de la función endocrina ovárica y de la fertilidad, aunque el porcentaje de conejas gestantes obtenido no fue significativo.

Diversas publicaciones en la literatura, de trasplante de órganos en ginecología experimental, realizados en diversas especies de animales, han omitido registrar alguno(s) de los diferentes tiempos quirúrgicos durante la cirugía del trasplante, como son el registro del tiempo de isquemia caliente, el tiempo de isquemia fría, el tiempo de las anastomosis tubaria, venosa y arterial; el tiempo quirúrgico en la donadora y en la receptora, así como el tiempo quirúrgico total del trasplante (38-40, 45-63, 76-93, 96, 97). Otros trasplantes han sido realizados, sin efectuar perfusión del injerto (81, 83, 85, 86) ni preservación del injerto en hipotermia (79, 85, 86). También han omitido describir el tipo de anastomosis empleada, material de sutura utilizado y número de puntos en cada una de las anastomosis realizadas, (85, 86). Por otro lado, al revisar la literatura en trasplante de órganos en ginecología experimental y clínica, encontramos que ningún estudio registró, de manera independiente el tiempo de isquemia caliente y ni el tiempo de isquemia fría, los cuales son de vital importancia para la viabilidad, sobrevida y función del injerto, además cada uno de estos tiempos, tiene un pronóstico diferente.

En trasplante de órganos, el aspecto técnico de la cirugía del trasplante, es uno los diversos factores que determinan la viabilidad, sobrevida y función del injerto, entre otros factores determinantes, se encuentra la compatibilidad del HLA, la inmunodepresión farmacológica utilizada; el daño de la isquemia-reperfusión, el cual es dependiente de la duración del tiempo de isquemia caliente, del tiempo de isquemia fría, de la solución de perfusión utilizada y de la

preservación del injerto en hipotermia.

Nuestro grupo realizó durante la técnica quirúrgica del trasplante tubo-ovárico una simulación de cada uno de los diferentes tiempos quirúrgicos que se realizan en el trasplante de órganos en la clínica. Trabajamos con dos equipos quirúrgicos, un primer equipo quirúrgico con la coneja donadora, para la procuración del injerto, y el 2º equipo quirúrgico con la coneja receptora, para perfusión, cirugía de “banco” y trasplante. Registramos cada uno de los diferentes tiempos quirúrgicos del trasplante, en la coneja donadora y en la coneja receptora, como son el tiempo de isquemia caliente, el tiempo de isquemia fría, el tiempo de cada una de las anastomosis y el tiempo quirúrgico total. Efectuamos perfusión hipotérmica del aloinjerto, además colocamos el injerto envuelto en una gasa con hielo para preservarlo en hipotermia a 4°C durante la triple anastomosis. Por otro lado al cateterizar la arteria ovárica, nos permitió realizar la perfusión hipotérmica intermitente del injerto durante la anastomosis venosa, lo que distendió la luz en ambos extremos del vaso (donador y receptor), evitando que las paredes de la vena sumamente delgadas se plieguen y adhieran, no incluyendo la pared posterior o anterior al momento de colocar cada punto, además permitió colocar cada punto de la anastomosis venosa en un solo tiempo quirúrgico (8 a 10 en total), en lugar de dos tiempos quirúrgicos tradicionales, lo que facilitó la técnica quirúrgica microvascular y abreviamos el tiempo quirúrgico para la anastomosis venosa; además la perfusión intermitente durante la anastomosis venosa, nos permitió observar que no existieran fugas al término de la misma. Para realizar las anastomosis vasculares, empleamos una pinza vascular en la vena receptora y no utilizamos pinza vascular en la vena del injerto, de la misma manera para la

anastomosis arterial, solamente utilizamos una pinza vascular en la arteria receptora y no utilizamos pinza vascular en la arteria del injerto, lo que disminuyó la tensión y traumatismo de los vasos durante las anastomosis, disminuyendo la posibilidad de trombosis.

Durante la exploración quirúrgica, al final del experimento, observamos que todos los aloinjertos con rechazo, presentaron algún grado de proceso adherencial y todos se encontraron encapsulados por tejido de aspecto peritoneal muy vascularizado, no se pudo identificar la trompa de Falopio ni el ovario, por la presencia de fibrosis. La técnica de microcirugía, permitió un manejo delicado de los tejidos, que disminuyó la presencia de adherencias en los dos grupos control (1 y 4), así como en dos, de tres conejas del grupo 3, que no presentaron rechazo.

El trasplante o implante de ovario y/o trompa de Falopio, o de útero, con el objetivo de restablecer la función endocrina ovárica y de fertilidad, ha sido estudiada en diversas especies de animales y en la mujer, empleando técnicas de macro y microcirugía vascular, con diversos resultados, usando en algunos casos de alotrasplante la inmunodepresión farmacológica como monoterapia a base de CsA, doble esquema con AZA-PDN, CsA-PDN y triple esquema con AZA-PDN-CsA (46,48, 54-59, 76-83, 86, 95). Diversos autores, en cirugía experimental han utilizado ciclosporina como monoterapia con diversos resultados, Green en 1982 (77) realizó 15 alotrasplantes de anexo tubo-ovárico y 5 alotrasplantes de ovario, ortotópicos en conejas, administró CsA 10 y 15 mg/kg/día y obtuvo 14 aloinjertos viables y 4 injertos con rechazo. Cornier en 1985 (82) informó de 12 alotrasplantes de trompa de Falopio y ovario ortotópico en la rata, administró 20 mg/kg/día de CsA, obtuvo 5 rechazos y 7 injertos viables. Scout en 1987 (83)

comunicó de 12 alotrasplantes de oviducto y ovario ortotópico en la rata, administró 15 mg y 5 mg/kg/día de CsA, obtuvo 7 injertos viables y 5 rechazos. Al Chalabi en 1991 (84) informó de 10 alotrasplantes de ovario ortotópicos en la coneja, administró CsA 15 mg/kg/día por 14 días, obtuvo 6 rechazos y 4 injertos viables. Carmona en 1993 (86) informó de 27 alotrasplantes de oviducto y ovario ortotópico en la coneja, administró CsA 15 y 5 mg /kg/día obtuvo 19 viables y 8 no viables.

Nosotros utilizamos CsA como monoterapia, consideramos que la dosis que administramos inicialmente de 10 mg/kg/día durante 3 semanas fue suficiente para mantener la viabilidad, sobrevida y función del injerto, como lo demuestran los niveles séricos de  $E_2$ ,  $P_4$  determinados durante las primeras 6 semanas del estudio, aunque la disminución a 5 mg/kg/día durante el resto del estudio resultó ser una dosis insuficiente para prevenir y tratar el rechazo del aloinjerto. En el grupo 3 de alotrasplante con la administración de CsA, obtuvimos 3 injertos viables y 5 con rechazo, los cuales se presentaron de manera tardía y la disfunción del ovario se vio reflejada en la caída de los niveles séricos de  $E_2$ ,  $P_4$  e incremento de FSH y LH posterior a la 6ª semana. El rechazo se presentó en todos los alotrasplantes, a los que no se les administró inmunodepresión farmacológica (grupo 2) caracterizado por destrucción del tejido ovárico, con intenso infiltrado linfocitario y sustitución por tejido conectivo fibroso, además del engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos. Observamos que la disminución en los niveles séricos de  $E_2$ ,  $P_4$  fue a partir de la segunda semana del postoperatorio, así mismo el incremento de los niveles de la FSH y LH fue también a partir de la segunda semana, lo que sugirió una disfunción o falla

ovárica.

Por lo que proponemos, que en el alotrasplante tubo-ovárico o de útero experimental, deberá manejarse la clásica terapia de inmunodepresión, que es utilizada en trasplante de órganos, que consiste en administrar: el tratamiento de inducción, el tratamiento de mantenimiento y el tratamiento del rechazo crónico-agudizado cuando éste se presenta, aunado a la monitorización de los niveles séricos óptimos de cada uno de los fármacos administrados; por otro lado, en el animal receptor, se deberá monitorizar la viabilidad y función del aloinjerto, a través de determinaciones séricas de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, FSH, LH, ultrasonido abdominal, citología vaginal seriada, entre otros, para realizar un diagnóstico y tratamiento oportuno de la disfunción del injerto.

Por otro lado, se han documentado daño al ovario en la coneja con la administración de CsA a dosis de 15 mg/kg/día, caracterizado por engrosamiento de la cápsula, fibrosis del estroma y cambios degenerativos en folículos y ovocitos (80,84), en nuestro estudio no encontramos este daño en la estructura del ovario en las tres conejas alotrasplantadas del grupo 3, que no presentaron rechazo, ni en el ovario de conejas del grupo 4, tal vez porque la dosis que administramos de ciclosporina, fue menor que la reportada por otros autores.

En cobayo, hámster y rata, el trasplante tubo-ovárico, resulta imposible realizar anastomosis termino-terminal (t-t), entre vasos ováricos donador-receptor, debido al diámetro aproximado de 0.15 mm de la arteria y vena ovárica, teniendo que recurrir a anastomosis t-t o t-l entre vena cava y arteria aorta, lo que resulta no adecuado transpolar los resultados para la mujer. La trompa de Falopio en estas especies, se encuentra enrollada, formando un ovillo junto con el ovario, por

lo técnicamente resulta imposible de realizar anastomosis t-t, en el oviducto de estos animales. Además la perfusión del injerto tubo-ovárico se realiza de manera indirecta a través de la arteria aorta y resulta no adecuada.

El trasplante tubo-ovárico en especies mayores como en la perra, oveja, cerda y primate, los inconvenientes son su mayor tamaño y peso, como la oveja con peso hasta de 70 kg (40) y cerdas hasta de 110 kg, así mismo en cerdas la longitud de los cuernos uterinos es de hasta 1.5 m. (63), lo que hace difícil la procuración y perfusión del órgano, por otro lado son excesivamente caros en su costo de manutención y requieren de grandes espacios para su estancia durante el estudio, difícil la toma de muestras sanguíneas para exámenes de laboratorio. El apareamiento y la reproducción, son con mayores dificultades (63).

El trasplante tubo-ovárico en coneja, resultó un excelente modelo experimental, que tiene muchas ventajas, son animales dóciles, de fácil manejo anestésico y quirúrgico, como quedó demostrado en nuestro estudio, en donde realizamos 55 cirugías inicialmente en todos los grupos y no tuvimos ninguna defunción durante el transoperatorio. Tienen un peso aproximado de 3 a 4 kg, con visibles y adecuadas venas y arterias periféricas en las orejas, para la cateterización, administración de soluciones y fármacos durante la cirugía, para la punción frecuente y obtención de sangre para los diversos estudios de laboratorio. No requieren grandes espacios para su estancia, el mantenimiento alimenticio es de bajo costo, fácil apareamiento y por presentar ovulación refleja, son fáciles de reproducir, con corta duración de la gestación (31 días, en promedio). Además por su similitud anatómica con la mujer, en cuanto a la longitud de la trompa de Falopio, la relación anatómica tubo-ovárica, cervicovaginal y la disposición del

pedículo vascular de los vasos ováricos, semejante al ligamento infundíbulo pélvico en la mujer, permite realizar anastomosis vascular t-t entre vasos ováricos, anastomosis t-t entre los oviductos y anastomosis t-t entre la vagina del injerto donado y la vagina en la coneja receptora. También la perfusión del injerto a través de la arteria ovárica, resulta fácil de realizar.

## **12. CONCLUSIONES.**

El alotrasplante tubo-ovárico ortotópico como unidad anatomo-funcional, con microcirugía vascular, técnicamente es posible y restableció la función endocrino-ovárica, así como la fertilidad.

La técnica quirúrgica microvascular utilizada en el alotrasplante tubo-ovárico, demostró ser confiable, con cero mortalidad durante el transoperatorio.

La administración de fármacos inmunodepresores es necesaria para evitar el rechazo del aloinjerto tubo-ovárico en la coneja.

El uso de Ciclosporina como inmunodepresor en la coneja con alotrasplante tubo-ovárico, permitió la viabilidad del mismo en el 37.5% de los casos, así como la recuperación de la fertilidad en el 12.5%.

La administración de ciclosporina, como monofármaco inmunodepresor con el esquema que la administramos, resultó insuficiente para evitar el rechazo en cinco conejas.

### 13. PERSPECTIVAS.

El alotrasplante tubo-ovárico estaría indicado en la mujer con disgenesia gonadal, cuando la paciente, ha tenido intervenciones quirúrgica con ooforectomía y/o salpingectomía bilateral, por enfermedad no maligna; en la mujer infértil por daño tubario (medial y distal) irreparable o cuando a la paciente infértil por las causas anteriores, se le ha realizado fertilización *in vitro* y transferencia de embriones a la cavidad uterina, y no ha tenido éxito.

El alotrasplante tubo-ovárico, sería una cirugía que desde un punto de vista ético es justificable, ya que al restaurar la fertilidad en la mujer, se mejorará su calidad de vida personal, marital, familiar, laboral y social. Además, se justifica por que el deseo de la maternidad es un derecho legítimo y universal, con lo cual se respeta la autonomía y justicia en estas mujeres. Por otro lado, en estos casos, la paciente receptora y la donadora, recibirán orientación de los riesgos-beneficios del procedimiento quirúrgico. De los riesgos de la medicación inmunodepresora, con dosis mínima-óptima, por tiempo limitado, para evitar, retardar y tratar el rechazo, así como de los riesgos para el recién nacido y, al aceptar, darán su consentimiento informado, cumpliendo de esta manera, con los restantes mandatos éticos, que son la beneficencia y la no maleficencia.

El trasplante tubo-ovárico alogénico ortotópico en la mujer infértil, sería una técnica más de reproducción asistida, con el objetivo de restaurar la fertilidad, sin los inconvenientes del FIV/TE como son: que es un procedimiento excesivamente caro y por lo mismo, limitado a un mínimo de la población infértil, con múltiples riesgos y complicaciones, incluso mortales para la madre y el recién nacido, sin olvidar los riesgos y complicaciones en la donadora de ovocitos.

Además, este procedimiento de reproducción asistida, no lo ofrece el Instituto Mexicano del Seguro Social. Por otro lado, el Instituto Mexicano del Seguro Social, cuenta con toda la infraestructura necesaria, para realizar el trasplante tubo-ovárico, y sería un procedimiento semejante a cualquier trasplante de órgano vital, con la diferencia de que al tratarse de un órgano no vital, la receptora del alotrasplante tubo-ovárico, se encontraría sin ninguna falla orgánica terminal de ningún órgano vital, clínicamente “sana”, inmunológicamente estable, que recibiría inmunodepresión farmacológica a dosis mínima-optima y, por tiempo limitado, pudiendo ser suspendidos sin peligro de pérdida de la vida, como ocurre, por ejemplo, en receptores de corazón e hígado. En cuanto a la donadora del injerto tubo-ovárico, se seleccionará a la de mejor histocompatibilidad, prefiriendo en primer lugar, a la donadora isogénica. Finalmente, debemos insistir que actualmente el trasplante de órganos se realiza rutinariamente en el IMSS en hospitales de 3er nivel, en todo el país.

**15. BIBLIOGRAFIA.**

1. Küs R. and Bourget P. An illustrated history of organ transplantation. Lab. Sandoz, Rueil Malmaison, France, 1992, pags 24-75.
2. Argüero R, Castaño R y Careaga G. Trasplante de corazón, pulmón y corazón-pulmón. JGH editores. México, 1995, pags 1-42.
3. Forsythe JLR. Transplantation surgery. Saunders Company. London, England, 1997, pags 1-63.
4. Santiago-Delpin EA, Ruiz-Speare JO. Trasplante de órganos. 2ª. Edición. JGH editores. México. 1999, pags 3-13.
5. Tan HP, Kaczorowski DJ, Basu A, Unruh M, McCauley J et al. Living donor renal transplantation using alemtuzumab induction and tacrolimus monotherapy. Am J Transp 2006; 6: 2409-17.
6. Longworth L, Young T, Beath SV, Kelly DA, Mistry H, et al. An economic evaluation of pediatric small bowel transplantation in the United Kingdom. Transplantation 2006; 82; 508-15.
7. Kelly DA. Current issues in pediatric transplantation. Pediatric Transplantation 2006; 10: 712-20.
8. Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Keck BM, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report-2006. Journal of Heart and Lung Transplantation 2006; 25: 880-92.
9. Kirchner GI, Rifai K, Cantz T, Nashan B, Terkamp C, et al. Outcome and quality of life in patients with polycystic liver disease after liver or combined liver-kidney transplantation. Liver Transplant 2006; 12: 1268-77.

10. Genzini T, Crescentini F, Torricelli FCM, Antunes I, Hayashi A, et al. Pancreas retransplantation: Outcomes of 20 cases *Transplan Proc* 2006; 38: 1937-38.
11. Felder PR, DiGallo A, Waldenmair M, Norden P, Winter A, et al. Health-related quality of life of pediatric patients receiving allogeneic stem cell or bone marrow transplantation: results of a longitudinal, multi-center study. *Bone Marrow Transplan* 2006; 38: 119 -26.
12. Calne RY, Thirus S, McMaster P, Graddock GN, White DJG, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donor. *The Lancet* 1978; 23: 1323-27.
13. Kahan BD. Drug therapy: Cyclosporine. *N Engl Med* 1989; 321:17-25.
14. Opelz G. Superior long-term kidney graft survival in patients on maintenance immunosuppression with cyclosporin and azathioprine. *Transplant proc* 1993; 25: 1289-90.
15. Ramirez CB, Doria C, DiFrancesco F, Laria M, Kang et al. Basiliximab Induction in Adult Liver Transplant Recipients With 93% Rejection-Free Patient and Graft Survival at 24 Months. *Transplant Proc* 2006; 38: 3633-35.
16. Salvadori M, Budde K, Charpentier B, Klempnauer J, Nashan B, et al. FTY720 versus MMF with cyclosporine in *de novo* renal transplantation: A 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia. *A J Transplant* 2006; 6: 2912-21.
17. Kirk AD. Induction immunosuppression. *Transplantation* 2006; 82: 593-602.
18. Penn I. Horizons in Organ Transplantation. Malignant neoplasms. *Surgical*

- Clinics of North America 1994; 5:1311-21.
19. Rubin RH. Pre-emptive therapy in immunocompromised hosts. *NEJM* 1991; 324: 1057-59.
  20. Nicholson V, Johnson PC. Infectious complications in solid organ transplant recipients. *Surgical Clinics of North America* 1994; 74: 1223-45.
  21. Murray JE, Reid DE, Harrison JH and Merrill JP. Successful pregnancies after human renal transplantation. *The New Eng J Med.* 1963; 269: 341-43.
  22. Armenti VT, Ahiswede MJ and Jarrel BE. National Transplantation Pregnancy Registry: Analysis of pregnancy outcomes of female kidney recipients with relation to time interval from transplant to conception. *Transplant Proc* 1993; 25: 1036-37.
  23. Davison JM, Redman CWG. Pregnancy post-transplant: the establishment of a UK. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104: 1106-17.
  24. Briggs JD, Jager K. The first year of the new ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1130-31.
  25. McKay DB, Josephson MA. Medical progress: pregnancy in recipients of solid organs-effects on mother and child. *N Engl J Med* 2006; 354: 1281-93.
  26. Armentl VT, Wilson GA, Radomski JS, Moritz MJ, Mcgrory CH, Coscia LA. Report from the National Transplantation Pregnancy Registry (NTPR): outcomes of pregnancy after transplantation. *Clin Transpl* 1999; 1: 111-19.
  27. Reinisch JM, Simon NG, Karow WG. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* 1978; 202: 436-37.
  28. Williamson RA, Karp LE. Azathioprine teratogenicity: review of the literature

- and case report. *Obstet Gynecol* 1981; 58: 247-53.
29. Masson RJ, Thomsom AW, Whiting PH. Cyclosporine induced fetotoxicity in the rat. *Transplantation* 1985; 39: 9-14.
  30. Bar Oz B, Hackman R, Einarson T, Koren G. Pregnancy outcome after cyclosporine therapy during pregnancy: a meta-analysis. *Transplantation* 2001; 71 : 1051-55.
  31. Kainz A, Harabaez I, Cowlrick, Gadgil SD, Shrikant D, et al. Review of the course and outcome of 100 pregnancies in 84 women treated with tacrolimus. *Transplantation* 2000; 70: 1718-21.
  32. Chevalier P, Poinsignon Y, Guillemain R, Amrein G and Parge D. Pregnancy after organ transplantation. *Presse Med (France)* 1996; 25: 1643-48.
  33. Bert P. De la greffe animale. Thèse médicale, Paris. 1863.
  34. Morris RT. The ovarian graft. *New York Medical Journal* 1895; 62: 436.
  35. Aubard Y, Teissier MP, Baudet JH. Greffes et transplantations ovariennes chez la femme : le point. *Rev fr Gynecol Obstet* 1993; 88: 583-90.
  36. Carrel A, Guthrie CC. Technique de la transplantation homoplastique de l'ovaire. *C R Soc Biol* 1906 ; 6: 466-68.
  37. Ritala AM. Tubentransplantation bei sterilitat in der Frau, verursacht durch occlusion tubae. *Acta Obstet Gynaecol Scand* 1946: 25: 493-527.
  38. Cohen BM. Vascularised homograft transplantation of the oviduct in the pig- a case reprot. *S Afr Med J* 1974; 48:162-71.
  39. Cohen BM. Preliminary experience with vascularized fallopian tube transplants in the human female. *Int J Fertil* 1976; 21: 147-52.

40. Cohen BM, Morgenthal JC, Davey AD, Van Niekerk CH, Uys CJ et al. Completed Pregnancy following vascularized heterotopic autotransplantation of the fallopian tube in the ewe. *Int J fertile* 1976; 21: 153-58.
41. Jacobson JH and Suárez EL. Microsurgery in the anastomoses of small vessels. *Surg Forum* 1960; 11: 243-44.
42. Chase MD and Schwarts SL. Sutured anastomoses of small arteries. *Surg Gynec Obstet* 1963; 117: 44-46.
43. Fisher B and Lee SH. Microvascular surgical technique in research with special reference to renal transplantation in the rat. *Surgery* 1965; 58: 904-14.
44. Smith JW Microsurgery. A review of the literature and discussion on microtechniques. *Plast Reconstr Surg* 1966; 37: 227-45.
45. Winston RML and McClure BJ. Pregnancy following autograft transplantation of fallopian tube and ovary in the rabbit. *The Lancet* 1974; 31: 494-95.
46. Wood C, Downing B, McKenzie I et al. Microvascular transplantation of the human fallopian tube. *Fertil Steril* 1978; 29: 607-13.
47. Barbot J and Parent B. Vascularized transplantation of the human fallopian tube with microsurgical techniques. Report of two cases. *Int J Microsurg (France)* 1979; 1: 8-12.
48. González-Merlo, Ausín J y Balasch. *Trasplante de órganos y tejidos*. Ed. Doyma, Barcelona 1987; 392-97.
49. Silver SJ. First fallopian tube-ovary transplant in carried out. *Wellcoms trends in Ob/Gyn*. 1985; jan: 2-9.

50. Von Theobald P, Roffé JL, Berrocal J, Le Porrier M, Levy G, et al. Autotransplantation ovarienne hétérotopique chez la femme. *Presse Méd* 1987; 16: 1239-41.
51. Muller G, Von Theobald P, Levy G, Roffe JL, Porrier. Première autotransplantation ovarienne hétérotopique chez la femme. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1988; 17: 97-102.
52. Leporrier M, Roffe JL, Von Theobald P, Muller G. Autologous transplantation of whole ovaries vs ovarian cortical strips. *JAMA* 2002; 287: 44-45.
53. Hilders CG, Baranski AG, Peters L, Ramkhelawan A, Trimbos JB. Successful human ovarian autotransplantation to the upper arm. *Cancer* 2004 ; 101: 2771-78.
54. Mhatre P, Mhatre J, Mordí B, Doshi S. The orthotopic Ovarian Transplant in Turner's Síndrome. *Int Pediatr* 2003; 18: 229-34.
55. Mhatre P, Mhatre J, Magotra. Ovarian Transplant: A New Frontier. *Transplant Proc* 2005; 37:1396-98.
56. Mhatre P, Mhatre J.tra. Ovarian Transplant- a new frontier-3 surgical techniques. *World Transplant Congress*. Boston, Massachusetts, USA. 2006 July 22-27. abstract 2013.
57. Mattingly RF, Clark DO, Lutsky II, Huang WY, StafI A et al. Ovarian function in uteroovarian homotransplantation. *Amer J Obstet Gynec* 1970; 108: 773-74.
58. Scott JR, Pitkin RM and Yannone ME. Transplantation of the primate uterus. *Surg Gynec Obstet* 1971; 133: 414-18.

59. Fageeh W., Raffa H, Jabbad H and Marzouki A. Transplantation of the human uterus. *Inter J Gynecol Obstet* 2002; 76: 245-51.
60. El-Akouri RR, Wranning CA, Mólne J, Kulberg G, Brännström M. Pregnancy in transplanted mouse uterus after long-term cold ischaemic preservation. *Hum Reprod* 2003; 18: 2024-30.
61. El-Akouri RR, Göran K, Brännström M. Successful uterine transplantation in the mouse: pregnancy and post-natal development of offspring. *Hum Reprod* 2003; 18: 2018-23.
62. El-Kouri RR, Mólne J, Groth K, Kurlberg G, Brännström M. Rejection patterns in allogenic uterus transplantation in the mouse. *Hum Reprod* 2006; 21: 436-42.
63. Wranning CA, El-Kouri RR, Lundmark C, Dahm-Kähler P, Mólne J, et al. Auto-transplantation of the uterus in the domestic pig (*Sus scrofa*): Surgical technique and early reperfusion events. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32: 358-67.
64. Fidler AT, Bernstein J. Infertility from a personal to a public health problem. *Public Health Rep* 1999; 14: 494-502.
65. Stephen EH and Chandra A. Updated projections of infertility in the United States:1995-2025. *Fertil Steril* 1998; 70: 30-37.
66. Ramírez ME, Villalobos R, Rodriguez DSJ. Estudio epidemiológico de mil parejas estériles. *Ginec Obstet Mex* 1989; 57: 67-72.
67. Posadas NA: Epidemiología de la esterilidad. Tesis, Hospital de Gineco Obstetricia "Luis Castelazo Ayala", I.M.S.S. México, D.F.1995. pags. 4-21.
68. Lunenfeld B, Insler V. Infertility: the dimension of the problem. In *Infertility:*

Male and Female, Insler V Lunenfeld B. (eds), 2a ed., Edimburg, UK, Livingstone, 1993. pags. 3-7.

69. Assisted reproductive technology in the United States: 2000 results generated from the American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil Steril* 2004; 81: 1207-1220.
70. Karnis MF, Zimon AE, Lalwani SI, Timmereck LS, Klipstein S, et al. Risk of death in pregnancy achieved through oocyte donation in patients with Turner syndrome: a national survey. *Fertil Steril* 2003; 80: 498-501.
71. Tamaki M, Ami M, Kimata N, Tsutsui T, Watanabe Y, et al. Successful singleton pregnancy outcome resulting from in vitro fertilization after renal transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1082-83.
72. McFaul PB, Patel N and Wills J. An audit of the obstetric outcome of 148 consecutive pregnancies from assisted conception: implications for neonatal services. *British J Obstet Gynecol* 1993; 100: 820-25.
73. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS. Ovarian tumors in cohort of infertile women. *N Engl J Med* 1994; 331:771-776.
74. Venn A, Watson L, Lummley J. Breast and ovarian cancer incidence after infertility and *in vitro* fertilisation. *Obstet Gynecol Surv* 1995; 346: 995-1000.
75. Watrelot A, Simonin B, Droguet J, Salvat J, Nahmanovici C et al. Transplantation tubaire expérimentale. *Rev Franc Gynéc* 1978 ; 73 : 355-59.
76. Scott JR, Keye WR, Poulson AM, Reynolds WA. Microsurgical ovarian transplantation in the primate. *Fertil Steril* 1981; 36: 512-15.

77. Green CJ, Simpkin S, Grimaldi G. Pregnancy after autografting and allografting vascularized ovaries and en bloc vascularized ovaries with adnexa in rabbits. *Brit J Obstet Gynaecol* 1982; 89: 645-51.
78. Denjean R, Boeckx W, Gordts S and Brosens I. Ovarian transplantation by selective microvascular anastomoses in the rabbit. *Brit J Obstet Gynaecol* 1982; 89: 652-56.
79. Iwasa Yoshihiko and Yanagino Kazuo. Experimental microsurgical utero-ovarian and tubal transplantation. *Asia-Oceania J Obstet gynaecol* 1983; 9: 101-108.
80. Al-Chalabi AA. Effect of Ciclosporin A on the morphology and function of the ovary and fertility in the rabbit. *Int J Fertil* 1984; 29: 218-23.
81. Al-Chalabi H. Autotransplantation of the rabbit ovary. *J Obstet Gynaecol* 1984; 5: 112-22.
82. Cornier E, Sibella P, Chatelet. Etudes histologiques et devenir fonctionnel des greffes de trompe et d'ovaire chez la rate (isogreffes et allogreffes traitées par Cyclosporine A). *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1985; 14: 567-73.
83. Scott JR, Hendrickson M, Lash, Shelby J. Pregnancy after tubo-ovarian transplantation. *Obstet Gynec* 1987; 70: 229-34.
84. Al-Chalabi AA. Allotransplantation of the rabbit ovary: experimental observations and their clinical relevance. *J Obstet Gynaecol* 1991; 11: 137-44.
85. Formelli G, Bondesan A, Rinaldi AM, Finelli C, Sani G. Tubo-ovarian transplantation in the treatment of sterility. Experimental research. *Boll Soc*

- Ital Biol Sper 1992; 68: 775-81.
86. Carmona F, Balasch J, Gonzalez-Merlo J. Ovarian function, tubal viability and pregnancy alter tubo-ovarian transplantation in the rabbit. *Hum Reprod* 1993; 8: 929-31.
  87. Lee S, Mao L, Wang Y, D'Silva, Yoo CH, et al. Transplantation of reproductive organs. *Microsurgery* 1995; 16: 191-98.
  88. Wang X, Bilolo KK, Shijie QI, Xu D, Jiang W, et al. Restoration of fertility in oophorectomized rats after tubo-ovarian transplantation. *Microsurgery* 2002; 22: 30-33.
  89. Jeremias E, Bedaiwy MA, Gurunluoglu R, Biscotti CV, Siemionow M, et al. Heterotopic autotransplantation of the ovary with microvascular anastomosis: a novel surgical technique. *Fertil Steril* 2002; 77: 1278-82.
  90. Bedaiwy MA, Jeremias E, Gurunluoglu R, Hussein MR, Siemianow M, et al. Restoration of ovarian function after autotransplantation of intact frozen-thawed sheep ovaries with microvascular anastomosis. *Fertil Steril* 2003; 79: 594-602.
  91. Yin H, Wang X, Kim SS, Chen H, Lin TanS, et al. Transplantation of intact rat gonads using vascular anastomosis: effects of cryopreservation, ischaemia and genotype. *Hum Reprod* 2003; 18: 1165-72.
  92. Revel A, Elami A, Bor A, Yavin S, Natan Y, et al. Whole sheep ovary cryopreservation and transplantation. *Fertil Steril* 2004; 82: 1714-5.
  93. Arav A, Revl A, Nathan Y, Bor A, Gacitua H, et al. Oocyte recovery, embryo development and ovarian function alter cryopreservation and transplantation of whole sheep ovary. *Hum reprod* 2005; 20: 3554-59.

94. Meraz MM, Revilla CM, Martínez CJ, Islas-Andrade S, Aburto EM. Restoration of endocrine function and fertility with a tubo-ovarian autotransplant as the anatomical-functional unit in rabbits using a vascular microsurgical technique. *Transplant Proc.* 2006; 38: 945-51.
95. Meraz MM, Gracida CJ, Melchor JL, Revilla CM, De Buen N, et al. Restoration of endocrine function and ovulation after a heterotopic ovarian transplant in the inguinal region using a vascular microsurgical technique. *Transplant Proc.* 2006; 38: 952-57.
96. Imhof M, Bergmeister H, Lipovac M, Rudas M, Hofstetter G, et al. Orthotopic microvascular reanastomosis of whole cryopreserved ovine ovaries resulting in pregnancy and live birth. 2006; 85: 1208-15.
97. Chen CH, Chen SG, Wu GJ, Wang J, Yu CP, et al. Autologous heterotopic transplantation of intact rabbit ovary after frozen banking at -196°C. *Fertil Steril* 2006; 86: 1059-66.
98. Norma Oficial Mexicana –NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación. Diciembre 9 de 1999.

## **ANEXO 1.**

El ensayo Access E<sub>2</sub> es un ensayo inmunoenzimático de unión competitiva. Se añade una muestra a un tubo de reacción con partículas paramagnéticas con cabra anti-conejo: conejo anti-estradiol y una solución de proteínas en tampón Tris. Después de 20 minutos se añade conjugado de estradiol con fosfatasa alcalina. El estradiol en la muestra compite con el conjugado de estradiol-fosfatasa alcalina por los lugares de unión en una cantidad limitada del anticuerpo antiestradiol específico. Los complejos antígeno-anticuerpo resultantes se unen al anticuerpo de captura en la fase sólida. Tras la incubación en un vaso de reacción, los materiales unidos a la fase sólida son retenidos en un campo magnético mientras que los materiales que no han quedado unidos a la fase sólida se eliminan mediante lavado. A continuación, se añade al tubo de reacción el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos 530 y se mide la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro. La producción de luz es inversamente proporcional a la concentración de estradiol en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina a partir de una curva de calibración de puntos múltiples almacenada.

### **Principios del procedimiento para progesterona.**

El ensayo Access P<sub>4</sub> es un ensayo inmunoenzimático de unión competitiva. Se añade una muestra a un tubo de reacción con anticuerpos de conejo anti-progesterona, conjugado de progesterona-fosfatasa alcalina y partículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos de cabra para captura anticonejo. La progesterona de la muestra compite con el conjugado de progesterona-fosfatasa alcalina por los lugares de fijación en una cantidad limitada de anticuerpos

específicos anti-progesterona. Los complejos resultantes antígeno-anticuerpo se fijan al anti-cuerpo de captura en la fase sólida. La separación en un campo magnético y el lavado eliminan los materiales no fijados a la fase sólida. Tras la incubación en un tubo de reacción, los materiales unidos a la fase sólida son retenidos en un campo magnético mientras que los materiales que no han quedado unidos a la fase sólida se eliminan mediante lavado. A continuación, se añade al tubo de reacción el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos 530 y se mide la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro. La producción de luz es inversamente proporcional a la concentración de progesterona en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina a partir de una curva de calibración de puntos múltiples almacenada.

#### **Principios del procedimiento para hormona folículo estimulante.**

El ensayo accesss hFSH es un ensayo inmunoenzimático de dos pasos secuencial ("sándwich"). Se añade una muestra a un tubo de reacción con partículas paramagnéticas recubiertas con complejos anticuerpo anti-ratón de cabra: anticuerpo anti-FSH de ratón y tampón salino TRIS con proteína. El hFSH se une al anti-cuerpo anti-hFSH de ratón inmovilizado en fase sólida. La separación en un campo magnético y el lavado posterior eliminan los materiales que no se han unido a la fase sólida. Tras esto, se añaden anticuerpos anti-hFSH de cabra conjugados con fosfatasa alcalina que se unen a las hFSH previamente unidas a las partículas. Se realiza una segunda separación y con otro lavado se elimina el conjugado que no se ha unido a la fase sólida. Tras la incubación en un tubo de reacción, separación en un campo magnético y lavado, retirar los materiales no unidos a la fase sólida. Se añade al tubo de reacción un sustrato

quimioluminiscente, Lumi-Phos 530 y se mide la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro. La producción de luz es directamente proporcional a la concentración de hFSH en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina a partir de una curva de calibración de puntos múltiples almacenada.

### **Principios del procedimiento para hormona luteinizante.**

El ensayo accesss hLH es un ensayo inmunoenzimático de dos pasos secuencial (“sándwich”). Se añade la muestra a un tubo de reacción con partículas paramagnéticas cubiertas con complejos anticuerpos anti-ratón de cabra: anticuerpos anti-hLH de ratón y tampón salino TRIS con proteína. El hLH se une al anticuerpo anti-hLH de ratón inmovilizado en la fase sólida. Los materiales unidos a la fase sólida son retenidos en un campo magnético mientras que los materiales que no han quedado unidos a la fase sólida se eliminan mediante lavado. Tras esto, se añade el anticuerpo anti –hLH de cabra conjugado con fosfatasa alcalina, el cual se une a las hLH que previamente se habían unido a las partículas. El conjugado que no se ha unido a las partículas se elimina mediante una segunda separación en campo magnético y otro lavado. Tras la incubación en un tubo de reacción, separación en un campo magnético y lavado, retirar los materiales no unidos a la fase sólida. A continuación, se añade al tubo de reacción el sustrato quimioluminiscente Lumi-Phos 530 y se mide la luz generada por la reacción utilizando un luminómetro. La producción de luz es directamente proporcional a la concentración de hLH en la muestra. La cantidad de analito en la muestra se determina a partir de una curva de calibración de puntos múltiples almacenada.

**El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas  
y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco**

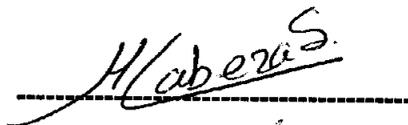
**aprobó la tesis que presentó:**

**M. en C. Manuel Martínez Meraz**

**El día 2 de mayo del 2007**

**Sinodales:**

**DOCTORA MARISA CABEZA SALINAS**

  
-----

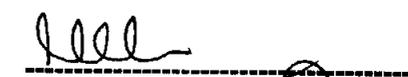
**DOCTORA MA. CRISTINA REVILLA MONSALVE**

  
-----

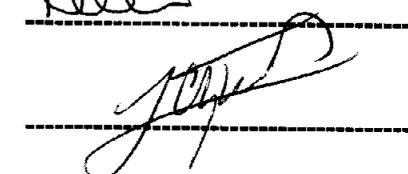
**DOCTOR RUBÉN ROMÁN RAMOS**

  
-----

**DOCTOR VICTOR SAÚL VITAL REYES**

  
-----

**DOCTOR SERGIO AGUSTIN ISLAS ANDRADE**

  
-----