



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

“DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO”

Requisito previo para optar por el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Autora: Izurieta Escobar, María Augusta.

Tutor: MD. Cárdenas Ponce, Jorge Luis.

Ambato – Ecuador

Marzo 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el tema:

“DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO” de Izurieta Escobar María Augusta estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Agosto del 2016

EL TUTOR

.....

MD. Cárdenas Ponce, Jorge Luis

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Informe de Investigación “**DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO**” como también los contenidos, ideas, análisis y conclusiones son de mi exclusiva responsabilidad, como autora del trabajo de grado.

Ambato, Agosto del 2016

LA AUTORA

.....

Izurieta Escobar, María Augusta

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi tesis con fines de difusión pública; además apruebo la reproducción de esta tesis, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Ambato, Agosto del 2016

LA AUTORA

.....

Izurieta Escobar, María Augusta

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema **“DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO”** de **Izurieta Escobar María Augusta**, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico

Ambato, Marzo del 2017

Para constancia firman

.....

PRESIDENTE/A

.....

1^{ER} VOCAL

.....

2^{DO} VOCAL

DEDICATORIA:

Dedico este trabajo de investigación a Dios por darme la fuerza necesaria para poder llegar hasta donde me encuentro. A mis padres por darme la vida y estar en todo momento junto a mí, apoyándome en mis estudios incondicionalmente ya que me han entregado su confianza para inspirarme y así vencer los obstáculos que se presenten en mi vida. A mis abuelitos por brindarme cariño por siempre estar bendiciéndome. A mi tía ya que ha sido como mi segunda madre y en especial se lo dedico a mi pequeño a mi hijo q ha sido mayor inspiración Denis Jadiel

AGRADECIMIENTO:

Quiero agradecer a Dios por permitirme alcanzar mis metas profesionales

A mis padres por su apoyo incondicional en mi etapa universitaria

A mí querida Universidad Técnica de Ambato.

A la Carrera de Laboratorio Clínico por abrirme las puertas Para formarme como profesional.

A los Docentes que me formaron académica y moralmente.

A mi tutor Dr. Jorge Luis Cárdenas Ponce quien me guío para la realización de mi Trabajo de Investigación

A las Instituciones de Salud que permitieron la realización del trabajo de investigación. Muchas gracias a todos ustedes

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.

PAGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR	v
DEDICATORIA:	vi
AGRADECIMIENTO:	vii
RESUMEN.....	xiii
SUMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
EL PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	2
1.1 TEMA:	2
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	2
1.2.1 CONTEXTO	2
1.2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:.....	4
1.3 JUSTIFICACIÓN:	4
1.4 OBJETIVOS:	6
1.4.1 OBJETIVO GENERAL:	6
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1. ESTADO DE ARTE:	7
2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO:	11
2.2.1 LA PROGESTERONA.....	11
2.2.1.1 SÍNTESIS.....	12

2.2.2 NIVELES DE PROGESTERONA	13
2.2.3 APARATO REPRODUCTOR.....	14
2.2.4 SISTEMA NERVIOSO	14
2.2.5 DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA:	15
2.2.6 ELISA	16
2.6.1. LOS DIFERENTES TIPOS DE ELISA SON:	17
2.2.7 FUNDAMENTO ELISA	17
2.2.8 PROGESTERONA ELISA.....	18
2.2.8.1 IMPORTANCIA CLÍNICA.....	18
2.2.8.2 PRINCIPIO DEL MÉTODO	19
2.2.8.3 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS.....	19
2.2.8.4 REACTIVOS NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT.....	20
2.2.9. LOS EFECTOS DE LA PROGESTERONA DURANTE EL EMBARAZO ..	28
2.2.10 EFECTOS ENDOCRINOS DE PROGESTERONA.....	28
2.2.11 EFECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA PROGESTERONA	29
2.2.12 PROGESTERONA EN EL EMBARAZO PRETERMINO Y EN AMENAZA DE ABORTO	34
2.2.13 EL ABORTO	35
2.2.14. TIPOS DE ABORTO.....	35
2.3 HIPOTESIS.....	36
2.4 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES.....	36
2.4.1 VARIABLE DEPENDIENTE:	36
2.4.2 VARIABLE INDEPENDIENTE:	36
CAPÍTULO III.....	37
MARCO METODOLÓGICO.....	37
3.1 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:	37
3.1.1 INVESTIGACIÓN ANALÍTICA.....	37

3.1.2 ENFOQUE	38
3.1.3 MODALIDAD BASICA DE LA INVESTIGACION.....	38
3.2 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO:.....	38
3.3 POBLACIÓN:.....	39
3.3.1 DISEÑO MUESTRAL:	39
3.3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	39
3.3.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:.....	40
3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:	41
3.5 DESCRIPCIÓN DE LA INTERPRETACION Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN:.....	43
3.6 ASPECTOS ÉTICOS:.....	44
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1 RESULTADOS:.....	45
4.2 CONCLUSIONES:	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
BIBLIOGRAFÍA.....	54
LINKOGRAFÍA:	63
BASE DE DATOS UTA:	63
ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Variable Independiente	41
Tabla N° 2 Variable Dependiente.....	42
Tabla N° 3 resultados	45
Tabla N° 4. Estadísticos descriptivos de la edad de las mujeres gestantes.	46
Tabla N° 5. Rango de edades en las mujeres embarazadas	47
Tabla N° 6. Caso / Control	48
Tabla N° 7. Estadísticos descriptivos de la Edad Gestacional	49
Tabla N° 8. Estadísticos descriptivos de los niveles de Progesterona en Embarazo normal	50
Tabla N° 9 Estadísticos descriptivos de los niveles de progesterona en Aborto	51
Tabla N° 10. Prueba t para comparación de niveles de progesterona con amenaza de aborto.....	52
Tabla N° 11. Estimación de riesgo para amenaza de aborto con los niveles de progesterona.	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1 Distribución de la Edad en las mujeres gestantes del estudio.....	46
Gráfico N°2 : Distribución de los rangos de edad en las mujeres gestante	47
Gráfico N° 3. Amenaza de aborto y aborto en curso vs embarazo normal.	48
Gráfico N° 4 Distribución de la edad gestacional de la población en estudio.	49
Gráfico N° 5. Niveles de Progesterona en Embarazo normal	50
Gráfico N° 6 Estadísticos descriptivos de los niveles de progesterona en Aborto....	51

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

**“DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES
EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER
TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL
HOSPITAL DOCENTE AMBATO”**

Autor: Izurieta Escobar, María Augusta.

Tutor: MD. Cárdenas Ponce, Jorge Luis.

Fecha: Agosto del 2016

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo la determinación de los valores de progesterona en mujeres que cursan el primer trimestre de embarazo y buscar la relación existente entre la presencia y riesgo de amenaza de aborto, para lo cual se realizó un estudio de tipo analítico, observacional, transversal donde se dividió a la población en un grupo control donde presentaban un embarazo normal, y otro con aborto; en mujeres con edad gestacional menor a 11 semanas, para la toma de muestras se observó que las pacientes cumplían con los criterios de inclusión la población de estudio fue de 30 pacientes con una edad media de 24 años. Donde se encontró que los niveles de Progesterona y la presencia de aborto en curso involuntario tienen asociación estadísticamente significativa entre los valores medios ($p < 0,0001$); las pacientes que tienen valores bajos de progesterona tienen mayor riesgo de aborto ($OR=1,6 - 2,5$ $IC=95\%$), por lo que se concluyó que la medición de los niveles de progesterona en pacientes con complicaciones del primer trimestre de embarazo puede facilitar el diagnóstico de un embarazo no viable.

PALABRAS CLAVES:

AMENAZA_DE ABORTO, ABORTO_INVOLUNTARIO, PROGESTERONA
SÉRICA.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

"DETERMINATION OF PROGESTERONE IN PREGNANT WOMEN CURSAN
THE FIRST QUARTER OF PREGNANCY AND ITS RELATIONSHIP WITH
ABORTION TO FLOCK TO BE SERVED IN HOSPITAL AMBATO"

Author: Izurieta Escobar, María Augusta.

Tutor: MD. Cárdenas Ponce, Jorge Luis

Date: Agost 2016

SUMARY

The present study aimed at determining the values of progesterone in women enrolled in the first trimester of pregnancy and find the relationship between the presence and risk of threatened miscarriage, for which an analytical, observational, cross-sectional study was performed where it divided the population into a control group which had a normal pregnancy , and the other with abortion; women with age gestational less than 11 weeks, for the sampling found that the patients met the inclusion criteria study population was of 30 patients with an average age of 24 years.

Where it was found that the levels of progesterone and the presence of abortion in involuntary course have statistically significant association between mean values ($p < 0.0001$); patients who have low levels of progesterone are at increased risk of abortion (OR = 1.6 - 2.5 CI = 95%), by which it was concluded that the measurement of progesterone levels in patients with the first trimester of pregnancy complications can facilitate the diagnosis of a non-viable pregnancy.

KEYWORDS:

ABORTION_ THREAT, MISCARRIAGE, SERUM_ PROGESTERONE.

INTRODUCCIÓN

El Aborto involuntario, definido como la pérdida del producto durante el embarazo antes de las 12 semanas de gestación, afecta aproximadamente al 1% de las parejas que intentan tener un hijo. Incluso después de una amplia investigación, una causa de aborto involuntario recurrente se identifica en menos de la mitad de estas parejas, el aborto involuntario recurrente inexplicable se asocia con consecuencias clínicas y psicológicas muy desfavorables para las mujeres y sus familias. Diversas estrategias terapéuticas para aumentar la tasa de nacidos vivos de estas mujeres han sido evaluadas, pero ningún tratamiento eficaz ha sido identificado.

La progesterona es esencial para lograr y mantener un embarazo saludable. Es secretada naturalmente por el cuerpo lúteo durante la segunda mitad del ciclo menstrual y por el cuerpo lúteo y la placenta durante el embarazo temprano. La progesterona prepara el endometrio para la implantación del embrión. Si se produce la implantación, el cuerpo lúteo continúa produciendo progesterona, pero entre 8 y 12 semanas de gestación, la placenta se hace cargo de este papel y mantiene el embarazo a partir de entonces.

La importancia fisiológica de la progesterona en el embarazo temprano ha llevado a la realización de varios ensayos para evaluar el efecto de la suplementación de la progesterona en el primer trimestre del embarazo entre las mujeres con antecedentes de abortos involuntarios recurrentes. Una revisión sistemática de cuatro ensayos pequeños mostraron un riesgo significativamente menor de abortos involuntarios entre las mujeres que recibieron progesterona que entre aquellos que recibieron placebo o ningún tratamiento, pero la calidad de los cuatro ensayos se consideró que era pobre.

El presente estudio trata de valorar la cantidad de progesterona y su relación con cualquier tipo de aborto involuntario.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 TEMA:

“Determinación de la progesterona en mujeres embarazadas y su relación con el aborto en el primer trimestre de gestación que acuden a ser atendidas en el Hospital Docente Ambato”

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

1.2.1 CONTEXTO

El Aborto involuntario recurrente afecta a alrededor del 1-3% de las parejas que están intentando concebir y se define como tres o más abortos involuntarios espontáneos consecutivos (1). Causas reconocidas de aborto involuntario recurrente incluyen trastornos genéticos, anomalías uterinas estructurales y condiciones pro trombóticas (2). Sin embargo, en aproximadamente la mitad de los casos de aborto espontáneo recurrente la causa subyacente permanece sin explicación (3).

Mientras otros autores mencionan que El aborto involuntario de repetición (AER) es considerada como la pérdida consecutiva de tres o más embarazos y afecta a aproximadamente el 0,5% de la población. (4)

Varios factores se han asociado con la pérdida recurrente del embarazo. Entre las diversas hipótesis, se postula que los cambios hormonales, inflamatorios y vasculares pueden estar implicados en el desarrollo del embarazo y el aborto. (5) (6) En este contexto, la importancia de la progesterona está bien documentada, que actúa desde las primeras etapas hasta el final del embarazo. (7) Las acciones biológicas de la

progesterona están mediadas por dos isoformas de su receptor (PR), respectivamente A y B. La acción de cada uno todavía no se conoce completamente. Se sabe que la respuesta celular final depende de la proporción en que se encuentran, y que el equilibrio espacio-temporal es esencial para el mantenimiento de la fertilidad y modulación de los efectos específicos de tejido inducida por la progesterona. (8)

La modulación de la expresión de receptores de progesterona depende de muchos factores. Está bien establecido, sin embargo, que es al menos parcialmente determinada genéticamente. El gen que codifica el receptor de progesterona en el ser humano es único y está situado en el cromosoma 11q22-23, responsable de la producción de dos isoformas de la proteína: PR-A y PR-B. (9)

Los recientes avances en las técnicas moleculares han dado lugar a la descripción de un gran número de polimorfismos genéticos, muchos de ellos han estudiado con respecto a las enfermedades ginecológicas y obstétricas. (10)

En promedio, la tasa de nacidos vivos de mujeres con aborto involuntario recurrente inexplicable es del 75% en un embarazo posterior, con una tasa de aborto involuntario del 20% hasta 9 semanas, y una tasa de aborto involuntario 5% después de este período. (11)

Sin embargo, el pronóstico varía dependiendo de la edad materna y el número de abortos involuntarios anteriores. La posibilidad de un embarazo posterior éxito después de tres abortos involuntarios de origen desconocido varía de alrededor del 54% en una mujer de 45 años de edad y aproximadamente el 90% en una mujer de 20 años de edad. Una mujer de 30 años de edad, con dos abortos involuntarios de origen desconocido tiene aproximadamente una probabilidad de 84% de un exitoso embarazo posterior, mientras que para una mujer de la misma edad con 5 abortos involuntarios de origen desconocido, la tasa de éxito se reduce a alrededor del 71%. Los estudios prospectivos de embarazos de bajo riesgo han encontrado que la presencia de anticuerpos anticardiolipina llevó a un período de tres a 9 veces mayor riesgo de pérdida fetal. Las mujeres con antecedentes de al menos tres abortos involuntarios anteriores y ninguna anormalidad aparte de la presencia de anticuerpos antifosfolípidos son altamente propensos a tener un aborto involuntario futuro. (12)

La progesterona juega un papel clave en la preparación del útero para la implantación del óvulo recién fecundado. Se ha sugerido que algunas mujeres que experimentan abortos espontáneos pueden no estar produciendo suficiente progesterona, por lo que mediante la administración de progesterona exógena puede ser posible para evitar aborto involuntario. En Vietnam, donde el aborto inducido está disponible bajo petición a partir de 1960, a pesar de aquello el aborto inseguro y el aborto involuntario están juntos siendo la cuarta causa de mortalidad materna. (13) Los médicos en Vietnam ampliamente prescriben progestágenos para el tratamiento del aborto involuntario amenazada. El uso generalizado de los progestágenos no se limita a lugares de escasos recursos. En Francia, por ejemplo, la progesterona es uno de los fármacos más prescritos durante el embarazo (14), y casi un tercio de las mujeres con amenaza de aborto se prescriben progestágeno en Italia (15). Al contrario que en los países desarrollados, la mayoría de los trabajadores de la salud y los formuladores de políticas en los países en desarrollo no tienen fácil acceso a la última información fiable sobre la atención efectiva. (16) Por lo tanto, es probable que, en los países en desarrollo, la extensión del uso de progestágeno durante el embarazo es mucho mayor que en los países desarrollados. El objetivo de esta revisión fue determinar la eficacia y seguridad de los progestágenos como tratamiento preventivo contra el aborto involuntario.

1.2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Los niveles de progesterona en mujeres embarazadas tiene relación con el aborto en el primer trimestre de gestación?

1.3 JUSTIFICACIÓN:

IMPORTANCIA: Dado que la progesterona es conocida por tener un importante papel fisiológico en el mantenimiento del embarazo, se ha usado para tratar a mujeres con amenaza de aborto involuntario y presuntamente mejorar las expectativas del curso del embarazo. Como resultado de la reciente evidencia en la prevención del parto prematuro A lo que conlleva a la inquietud científica de qué si es o no útil la determinación sérica de esta hormona en el primer trimestre de gestación.

VIABILIDAD: Porque se contó con muestras de las pacientes gestantes del Hospital Docente Ambato en el primer trimestre de embarazo en curso normal y otras que presentaron un cuadro de aborto, así también se contó con los instrumentos necesarios para desarrollar la investigación como es el equipo Stat Fax 4700 proporcionados por el laboratorio clínico OMEGA para la determinación de la progesterona.

IMPACTO: La investigación se encuentra enfocada en problemas de salud materno-infantil, los enfoques de búsqueda de etiología del embarazo influyen directamente y de manera positiva en la disminución de la mortalidad materno-infantil.

Es indispensable señalar que la progesterona produce cambios secretorios en el revestimiento del útero esenciales para la implantación exitosa de un óvulo fertilizado. Es secretada principalmente por el cuerpo lúteo, un grupo de células formadas en el ovario después el folículo se rompe durante la liberación del óvulo. Se ha sugerido que un factor causal en muchos casos de aborto involuntario puede ser una secreción insuficiente de progesterona durante la fase lútea del ciclo menstrual y en las primeras semanas de embarazo. Por lo tanto, los progestágenos se han utilizado, a partir del primer trimestre del embarazo, en un intento de prevenir aborto involuntario espontáneo.

Su uso es particularmente común con las técnicas de reproducción asistida. Los tratamientos hormonales concluyeron que los beneficios de la terapia son inciertas y los suplementos de progesterona exógena después de la concepción no mejora los resultados del embarazo. Se concluyó que los niveles bajos de progesterona en el embarazo temprano reflejan un alto riesgo de aborto involuntario.

ORIGINALIDAD: La presente investigación tiene un enfoque comparativo ya que nunca se ha realizado en investigaciones previas en Ambato, las investigaciones previas que se habían realizado de determinación de progesterona no han realizado una correlación con el aborto. La importancia del problema se ve reflejada en que en muchas ocasiones el personal médico no solicita exámenes hormonales e inclusive envía tratamiento a base de progestágenos sin justificar si la paciente amerita dicha terapéutica.

La determinación de progesterona ante la sospecha de una amenaza de aborto se vería justificada en todas las gestantes primero por la elevada incidencia de ésta complicación y además porque su síntesis defectuosa por parte del cuerpo lúteo o el trofoblasto supone un desarrollo anormal del embarazo, con lo que se podría predecir de alguna manera la viabilidad del producto de la concepción.

BENEFICIARIOS: Los beneficiarios son las mujeres que cursan el primer trimestre de gestación, debido a que con los resultados obtenidos de los niveles de progesterona puede ayudar a prevenir los abortos involuntarios y evitar oportunamente este problema. Los beneficiarios indirectos serán los estudiantes de la carrera de laboratorio clínico debido que mediante este proyecto les puede ayudar en un estudio acerca de las hormonas en este caso la progesterona en el periodo de gestación

INTERÉS: El estudio es de mucho interés ya que la progesterona se ve involucrada en el embarazo promueve el curso normal y desarrollo del feto.

1.4 OBJETIVOS:

1.4.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar los niveles de Progesterona en las Mujeres Embarazadas y su relación con el Aborto en el Primer Trimestre de gestación que acuden a ser atendidas en el Hospital Docente Ambato.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar a las mujeres embarazadas que cursan el primer trimestre de gestación.
- Determinar los niveles de progesterona en las Mujeres Embarazadas que cursan el primer trimestre de Gestación con un embarazo normal.
- Determinar los niveles de progesterona en las Mujeres Embarazadas que presentaron aborto involuntario.

- Correlacionar los niveles de progesterona con el aborto en el primer trimestre de gestación de las mujeres que acuden a ser atendidas en el Hospital Docente Ambato.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ESTADO DE ARTE:

El valor de medida de progesterona en mujeres con aborto involuntario recurrente ha sido examinado en un estudio previo (17) en donde se encontró que la medición de progesterona no fue predictivo para viabilidad del embarazo. Sin embargo, había dos limitaciones: (i) el estudio incluyó que las mujeres con sólo dos abortos involuntarios, mientras que los criterios diagnósticos utilizados actualmente para aborto involuntario recurrente es tres o más abortos involuntarios; y (ii) el autor utiliza un valor de progesterona de corte arbitrario de 10 ng / ml para definir la normalidad, pero no tuvo en cuenta el impacto de la utilización de diferentes puntos de corte en los resultados.

Una vez que el cuello uterino comienza a dilatarse, la pérdida del embarazo es inevitable. La pérdida puede causar problemas emocionales como depresión, alteración del sueño e ira. Se encontró que las mujeres que continuaron con su embarazo después de una amenaza de aborto espontáneo presentaban un aumento del riesgo de hemorragias antes del parto, ruptura de membranas antes del trabajo de parto, parto prematuro y restricción del crecimiento intrauterino. El progestágeno es una hormona esencial tanto para establecer como para mantener el embarazo. Por lo tanto, es un tratamiento posible para la amenaza de aborto espontáneo. Aunque ha habido mucha especulación de que los progestágenos pueden reducir la tasa de aborto involuntario, los resultados que se presentaran a continuación muestran una

diferencia estadísticamente significativa entre las mujeres que recibieron progesterona y los que recibieron sólo placebo o ningún tratamiento, cuando no esté prevista para la historia obstétrica. El análisis de subgrupos según el método de administración (oral, intramuscular o vaginal) tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos progestágeno y placebo. Sin embargo, cuando se previó la historia obstétrica, por medio de un análisis de subgrupos incluidas las mujeres que habían sufrido tres o más abortos involuntarios consecutivos directamente antes del embarazo estudiado, se encontró una diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo de progestágeno. Este hallazgo debe ser abordado con precaución, sin embargo, como los números son pequeños y los ensayos fueron de baja calidad metodológica. (18) Además, algunos estudios incluyeron datos de las mujeres que tenían dos o más abortos involuntarios, pero como esto no es la definición clásica de aborto involuntario recurrente, un análisis separado que incluye estas mujeres no se llevan a cabo. El metanálisis no mostró una diferencia estadísticamente significativa en el número de anomalías fetales (incluyendo virilización e hipospadias) en los bebés cuyas madres habían recibido progestágenos, mientras que in vitro, ni en la muerte intrauterina nacimiento / o aún la muerte neonatal. (19)

De los estudios que administró el tratamiento por vía oral, un estudio utilizó una dosis de 10 mg / día de medroxiprogesterona, mientras que un estudio utilizó una dosis escalonada de medroxiprogesterona (20 mg / día durante tres días, seguido de 10 mg / día para 11 día, luego aumentó la dosis dos momentos diferentes después de la duración del estudio). Un estudio utilizó una dosis dos veces al día de éter ciclopentilo enol de la progesterona, mientras que los dos últimos utilizaron 10 mg de didrogesterona por vía oral, dos veces al día o tres veces al día. En los cuatro estudios que administraron el tratamiento IM, dos estudios utilizaron una dosis de 500 mg de caproato de hidroxiprogesterona, un estudio utilizó 200 mg de progesterona natural durante tres días seguidos de 340 mg hidroxiprogesterona caproato dos veces a la semana durante 11 día, mientras que el cuarto estudio utilizó una dosis escalonada, también de caproato de hidroxiprogesterona, de entre 250 a 500 mg dependiendo de semanas de gestación. Los dos estudios que utilizaron ya sea vía oral o intramuscular de la administración, pero no informó de los resultados para las mujeres por separado, utilizan 15 a 20 mg / día por vía oral de alilestrenol o 250

mg IM de caproato de hidroxiprogesterona diaria o cada otro día, y 10 mg / día por vía oral de alilestrenol o 25 mg IM cada cinco días de caproato de hidroxiprogesterona, respectivamente.

Estudios restantes entregan a través de un tratamiento de 25 mg supositorios de progesterona dos veces al día, 200 mg tres veces supositorios de progesterona y seis veces diarias de 25 mg pastillas de progesterona insertan dentro del músculo glúteo, respectivamente. Ha habido mucha discusión acerca de si progestágenos puede prevenir el parto prematuro (11). No hubo diferencia estadísticamente significativa en el metanálisis entre el número de nacimientos prematuros en los grupos progestágeno y placebo. Sin embargo, es importante señalar que esta revisión sistemática sólo evalúa progestágeno dada al principio del embarazo para prevenir aborto involuntario, en lugar de los ensayos que evalúan progestágeno dada en el segundo o tercer trimestre para tratar de prevenir el parto prematuro.

En una parte de los casos hay una deficiencia de progesterona. Los datos de 358 mujeres que se presentan con sangrado vaginal en las primeras 18 semanas de gestación indicaron que un solo valor de progesterona de menos de 45 nmol / l (14 ng / ml) es capaz de diferenciar entre los embarazos anormales y normales (en curso), con una sensibilidad de 87,6% y una especificidad del 87,5% (62).

Los datos relativos del perfil de citoquinas en mujeres con amenaza de aborto son relativamente escasos. Paradisi et al. (20) informaron sobre las concentraciones en suero significativamente más bajas de los T-helper citoquinas de tipo IL-6, IL-10 e IL-13 en mujeres con abortos recurrentes, pero no en aquellos con amenaza de aborto, en comparación a la normalidad del embarazo y no embarazada. Otro estudio (21) la investigación de las concentraciones séricas de las citocinas proinflamatorias, IL-8 e IL-12, así como la del receptor soluble de la interleucina-2 (RIL-2R) mostró que los patrones de citoquinas en abortos y amenaza de aborto con un favorable resultado asemejan al embarazo normal. Un reciente estudio prospectivo no pudo detectar una deficiencia de citoquinas de tipo Th2 en la amenaza de aborto, y no indicó ninguna diferencia entre Th1 y perfiles de tipo Th2 citoquinas de las mujeres con síntomas clínicos de la amenaza de aborto y los que tienen embarazos normales (22). En una línea similar, Gucer et al. (23) no detectó una diferencia significativa en el aumento de los niveles del receptor de IL-2 y TNF-alfa en pacientes con amenaza

de aborto con un resultado favorable. Estos datos sugieren que en las mujeres con los perfiles de citoquinas y la presencia amenaza de aborto se correlaciona con el nivel, en lugar de con la condición en sí.

En la sangre periférica de mujeres embarazadas sanas se encontró que el porcentaje de linfocitos positivos PIBF a ser significativamente mayor en todos los trimestres del embarazo que en las mujeres con síntomas clínicos de la interrupción del embarazo prematuro amenazado. (24). En las muestras de orina de mujeres embarazadas sanas las concentraciones PIBF aumentan continuamente hasta la semana 37 de gestación, seguida de una lenta disminución hasta el término. En los embarazos que terminan en aborto involuntario o parto prematuro, los niveles de PIBF en orina no aumentan durante el embarazo (25). Además, se encontraron concentraciones de PIBF en orina entre las mujeres con amenaza de aborto y puede ser significativamente menor que en los controles sanos de la misma edad gestacional (26). Por otra parte, las concentraciones de orina de PIBF en la amenaza de aborto cuyos embarazos terminó en aborto involuntario se redujo significativamente en comparación con los que tienen embarazos en curso (26). Check et al. (27) determinaron la expresión de PIBF en linfocitos de 3 a 5 semanas de gestación por inmunocitoquímica. Aunque este estudio tuvo una fuerza insuficiente para alcanzar significación estadística, que mostró una tendencia a mayores tasas de aborto involuntario cuando PIBF estaba ausente.

Salomon et al. (28) analizaron la tasa de expresión de PIBF por linfocitos periféricos en las mujeres embarazadas sanas después de la administración de la mifepristona para la terminación no quirúrgica del embarazo en 5-8 semanas de gestación. En 17 de los 21 pacientes, el porcentaje de linfocitos PIBF positivos disminuyó después de la administración anti-progesterona. Estos datos sugieren que las alteraciones mifepristona induce la inmunosupresión mediada de la progesterona y pueden contribuir a la terminación del embarazo.

La progesterona se prescribe en el 15-40% de las mujeres con amenaza de aborto involuntario (29). Recientemente, en un estudio aleatorio Omar et al. (30) demostraron que el tratamiento con didrogesterona en la amenaza de aborto durante el primer trimestre del embarazo podría mejorar el resultado del embarazo. La tasa de éxito del embarazo en curso fue significativamente mayor ($p = 0,037$) en las

mujeres tratadas con didrogesterona (95,9%) en comparación con las mujeres que recibieron un tratamiento conservador (86,3%). El odds ratio de la tasa de éxito entre el tratamiento con didrogesterona y no tratamiento fue de 3,77 (IC: 1,009 a 14,108). En otro estudio prospectivo (26) entre amenaza de aborto sometidos a tratamiento didrogesterona la duración de la gestación no difirió significativamente de las mujeres embarazadas sanas, ni el peso medio al nacer de los recién nacidos. La incidencia de parto prematuro todavía era mayor en el grupo amenaza de aborto, pero la diferencia entre los dos grupos no alcanzó significación estadística. La importancia de la progesterona en el mantenimiento del embarazo se demostró mediante el uso exitoso de los antagonistas de progesterona, tales como mifepristona (RU 486) en la inducción del aborto electivo. En un ensayo controlado aleatorio publicado recientemente, el uso de la progesterona 17-alfa hidroxilo en la prevención del parto prematuro fue demostrado ser eficaz en la reducción de las tasas y todos los efectos adversos del trabajo de parto prematuro. Esto plantea la cuestión acerca de la importancia de la vía de administración y el tipo de progestágeno utilizado para prevenir el parto prematuro. Estas mismas preguntas se pueden aplicar al uso de los progestágenos en el tratamiento de la amenaza de aborto involuntario. El tratamiento con progestágenos se ha relacionado con el desarrollo de hipospadias (deformidad del pene) en el feto macho; Sin embargo, hay poca evidencia de teratogenicidad.

2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO:

2.2.1 LA PROGESTERONA

La progesterona, también conocida como P4 (pregn-4-en-3,20-diona), es una hormona esteroidea C-21 involucrada en el ciclo menstrual femenino, embarazo (promueve la gestación) y embriogénesis de los humanos y otras especies. La progesterona pertenece a una clase de hormonas llamadas progestágenos, y es el principal progestágeno humano de origen natural. Su fuente principal es el ovario (cuerpo lúteo) y la placenta, la progesterona también puede sintetizarse en las glándulas adrenales y en el hígado. La progesterona es una de las hormonas sexuales que se desarrollan en la pubertad y en la adolescencia en el sexo femenino, actúa principalmente durante la segunda parte del ciclo menstrual, parando los cambios endometriales que inducen los estrógenos y estimulando los cambios madurativos,

preparando así al endometrio para la implantación del embrión. Estos efectos también ocurren en las mamas. La progesterona también se encarga de engrosar y mantener sujeto al endometrio en el útero: al bajar sus niveles, el endometrio se cae, produciendo la menstruación. Es la hormona responsable del desarrollo de caracteres sexuales secundarios en una mujer, y sirve para mantener el embarazo (31).

La progesterona desempeña un papel fundamental en la preparación del útero para la implantación del óvulo recientemente fertilizado. Se ha sugerido que algunas mujeres que experimentan abortos espontáneos pueden no producir progesterona suficiente; por lo tanto, al administrar progesterona exógena es posible que el aborto espontáneo pueda evitarse. En Vietnam, donde desde 1960 el aborto inducido está disponible cuando se lo solicita, el aborto inseguro y el aborto espontáneo siguen siendo en conjunto la cuarta causa de mortalidad materna. Los médicos de Vietnam prescriben ampliamente progestágenos para el tratamiento de la amenaza de aborto espontáneo. El uso generalizado de progestágenos no se limita a los lugares de escasos recursos. En Francia, por ejemplo, la progesterona es uno de los fármacos que se recetan con mayor frecuencia durante el embarazo y, en Italia, a prácticamente un tercio de las mujeres con amenaza de aborto espontáneo se les receta progestágenos. A diferencia de lo que sucede en los países desarrollados, la mayoría de los profesionales de atención de la salud y los planificadores de políticas de los países en desarrollo no pueden acceder fácilmente a la información confiable y actualizada en atención sanitaria efectiva. Por lo tanto, es probable que en los países en desarrollo la extensión del uso de progestágenos durante el embarazo sea mucho mayor que en los países desarrollados (32).

2.2.1.1 SÍNTESIS

La progesterona, al igual que todas las demás hormonas esteroideas, se sintetiza en Pregnenolona, un derivado del colesterol. Esta conversión se lleva a cabo en dos fases. El grupo 3-hidroxilo se convierte en un grupo ceto y el doble enlace se traslada al C-4 de C-5. La progesterona es el precursor de la actividad mineralcorticoide aldosterona, y después de la conversión de 17-hidroprogesterona (otro progestágeno natural), de cortisol y la androstenediona. La Androstenediona puede convertirse en testosterona, estrona y estradiol (31).

La progesterona se produce en las glándulas suprarrenales, las gónadas (específicamente después de la ovulación en el cuerpo lúteo), el cerebro y, durante el embarazo, en la placenta. En los seres humanos, el aumento de las cantidades de progesterona se produce durante el embarazo: Inicialmente, la fuente es el cuerpo lúteo que ha sido "rescatados" por la presencia de gonadotropinas coriónica humana (hCG) desde el conceptus. Sin embargo, después de la 8ª semana la producción de progesterona cambia sobre la placenta. La placenta materna utiliza el colesterol como el sustrato inicial, y la mayor parte de la progesterona producida entra en la circulación materna, pero parte de esta es captada por la circulación fetal y se utiliza como sustrato para los corticoides fetales. Al término del embarazo la placenta produce alrededor de 250 mg de progesterona por día (1).

Una fuente adicional de la progesterona son los productos lácteos. Contienen mucho porque en las explotaciones lecheras las vacas son ordeñadas durante el embarazo, cuando el contenido de progesterona de la leche es alta. Tras el consumo de productos lácteos el nivel de biodisponibilidad de progesterona aumentada. Esta observación ha dado lugar a la preocupación de que una dieta alta en productos lácteos de origen animales podría producir enfermedades (33).

2.2.2 NIVELES DE PROGESTERONA

En las mujeres, los niveles de progesterona son relativamente bajos durante la fase preovulatorio del ciclo menstrual, aumentando después de la ovulación, y se encuentra elevada durante la fase lútea. En las mujeres los niveles de progesterona tienden a ser <2 ng/ml antes de la ovulación, y >5 ng/ml después de la ovulación. Si la mujer se embaraza embarazo, los niveles de progesterona se mantienen en los niveles iniciales de la fase lútea. Con el inicio de la fase lútea-placentaria el cambio de la progesterona comienza a aumentar aún más y puede llegar a 100-200 ng/ml a plazo. Una disminución en los niveles de progesterona es fundamental para el inicio del trabajo de parto, se ha argumentado. Tras la expulsión de la placenta y durante la lactancia, los niveles de progesterona son muy bajos (34).

Los niveles de progesterona son relativamente bajos en los niños y las mujeres posmenopáusicas. Los hombres adultos tienen niveles similares a los de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual (35).

La progesterona ejerce su acción principalmente a través del receptor intracelular de progesterona, la membrana del receptor de progesterona obligado también se ha postulado. La progesterona tiene una serie de efectos fisiológicos que son amplificados por la presencia de estrógeno.

2.2.3 APARATO REPRODUCTOR

La progesterona es a veces llamada la "hormona del embarazo", y tiene muchas funciones relacionadas con el desarrollo del feto: La progesterona transforma el endometrio para su etapa de preparación del útero para su implantación. Al mismo tiempo la progesterona vaginal afecta el epitelio y el moco cervical, lo que hace el moco sea espeso e impermeable a los espermatozoides. Si el embarazo no se produce, los niveles de progesterona disminuyen, dando lugar, a la menstruación. El Sangrado menstrual normal es progesterona en retirada (19).

Durante la implantación y la gestación, aparece la progesterona para disminuir la respuesta inmune materna para permitir la aceptación del embarazo. La progesterona disminuye la contractilidad uterina del músculo liso. Además, la progesterona inhibe la lactancia durante el embarazo. La caída en los niveles de progesterona después del parto es uno de los estimuladores para la producción de leche. Un descenso en los niveles de progesterona es, posiblemente, un paso que facilita la aparición del parto. El feto metaboliza progesterona placentaria en la producción de la glándula suprarrenal y mineralo-glucocorticoides (36).

2.2.4 SISTEMA NERVIOSO

La progesterona, al igual que Pregnenolona y dehidroepiandrosterona, pertenece al grupo de neuroesteroides que se encuentran en concentraciones elevadas en algunas zonas en el cerebro y se sintetizan en ese lugar. Los Neuroesteroides afectan el funcionamiento sináptica, son neuroprotectores, y afectan la mielinización. Ellos son investigados por su potencial para mejorar la memoria y capacidad cognitiva. La progesterona como neuroprotector afecta la regulación de la apoptosis de los genes.

Su efecto como Neuroesteroide trabaja predominantemente a través de la GSK-3 beta vía, como un inhibidor (otras GSK-3 beta inhibidores incluyen estabilizadores del humor, litio y ácido alproico.) (37)

Factor de crecimiento epidérmico-1, un factor que suele utilizarse para inducir la proliferación, y mantención de los cultivos, de las células madre. Aumenta la temperatura central (función termogénica) durante la ovulación. Reduce espasmos y relaja los músculos blandos. Los Bronquios abren y el moco está regulado. (Receptores de progesterona están ampliamente presentes en el tejido submucoso). Actúa como un agente antiinflamatorio y regula la respuesta inmunitaria. Reduce la actividad de la vesícula biliar. Normaliza la coagulación de la sangre y el tono vascular, los niveles de zinc y el cobre, los niveles de oxígeno celular, y el uso de reserva de grasa para energía (38).

Ayuda a la función tiroidea en la construcción de osteoblastos, en los huesos, dientes, encías, conjuntiva, tendón, ligamento y la resistencia dérmica y en algunos casos de reparación mediante la regulación de diversos tipos de colágeno, y en la función y reparación nerviosa por la regulación de la mielina.

Al parecer, para prevenir el cáncer de endometrio (que implica el epitelio de revestimiento del útero) mediante la regulación de los efectos del estrógeno.

2.2.5 DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA:

Progesterona en sangre o análisis de progesterona en la sangre es un análisis de sangre que mide la cantidad de progesterona. La progesterona es una hormona producida principalmente en los ovarios. En las mujeres, la progesterona juega un papel vital en el embarazo. Después de que los ovarios liberan un óvulo (ovulación), la progesterona ayuda a preparar el útero para la implantación de dicho óvulo fecundado. Ésta prepara a la matriz (útero) para el embarazo y las mamas para la producción de leche. Los hombres producen alguna cantidad de progesterona, pero probablemente no tiene una función normal, a excepción de ayudar a producir otras hormonas esteroideas (35).

Este examen se hace para: Determinar si una mujer está ovulando. Evaluar a una mujer con abortos espontáneos repetitivos, aunque otros exámenes diagnósticos y

tratamientos se usan con más frecuencia para este propósito. Determinar el riesgo de aborto espontáneo o embarazo ectópico a comienzos del embarazo (7). ng/mL = nanogramos por mililitro.

2.2.6 ELISA

Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costes del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que, si no se ajustan correctamente, puede afectar los pasos sucesivos y el resultado de la prueba. (18).

Se trata de una técnica de laboratorio que fue diseñada por científicos suecos y holandeses en 1971, que permite detectar pequeñas partículas llamadas **antígenos**, que habitualmente son fragmentos de proteínas. La identificación es específica, es decir, consigue que pequeños segmentos de proteínas destaquen y no puedan ser confundidas con otras.

Para poder identificar los antígenos se utilizan moléculas con dos componentes acoplados: un **anticuerpo** que se une al antígeno de forma específica y una **enzima** que se activa y señala la unión al antígeno. Antes del descubrimiento del

Gracias a esta técnica se han podido realizar estudios científicos en campos como la biología, la bioquímica y la medicina. En el hospital se utiliza principalmente para identificar gérmenes agresores que se encuentran en la **sangre**, orina, esputos.

2.6.1. LOS DIFERENTES TIPOS DE ELISA SON:

- ✓ **ELISA directo:** es la forma más básica de realizar la técnica. Consiste en recoger una muestra a estudiar y ponerla en un pocillo (un recipiente pequeño) en frente de una muestra igual pero contaminada con el germen a estudiar, y otra muestra en la que se sabe que no hay germen. Se aplica el anticuerpo con la enzima en los tres pozos y se compara la muestra a estudio con las otras dos.
- ✓ **ELISA indirecto:** se realiza de forma similar al ELISA directo, pero en este caso se añade primero un anticuerpo sin enzima y después uno con enzima. De esa forma, la señal que emite el enzima es mucho más potente y la prueba es más sensible.
- ✓ **ELISA *sándwich*:** en este caso en los pocillos primero se añade un anticuerpo y después la muestra, para que los antígenos queden ya retenidos en el fondo del pozo. Después se añade el anticuerpo con la enzima. Es la forma más eficaz de realizar la prueba.
- ✓ **LISPOT:** se trata de un tipo de ELISA que permite conocer de forma cuantitativa el antígeno, incluso identifica el número concreto de células donde se encuentra.

2.2.7 FUNDAMENTO ELISA

El Elisa se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes antígeno o anticuerpo marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte inmunoabsorbente la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

2.2.8 PROGESTERONA ELISA

2.2.8.1 IMPORTANCIA CLÍNICA

Es una hormona esteroide que participan en el ciclo menstrual, el embarazo, apoyo a la gestación y la embriogénesis de los seres humanos y otras especies.

La progesterona es importante para la síntesis de aldosterona (mineralocorticoides), y el 17-oh progesterone para la síntesis de cortisol (glucocorticoides).

Los niveles de progesterona son relativamente bajos en niños y en mujeres posmenopáusicas. Los hombres adultos tienen niveles similares a los de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual.

En las mujeres, los niveles de progesterona son relativamente bajas durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual, aumentan después de la ovulación y se elevan durante la fase lútea.

En caso de embarazo, los niveles de progesterona son similares a los niveles en la fase lútea. Después del nacimiento y durante la lactancia los niveles de progesterona son bajos, la caída en los niveles de progesterona después del parto e uno de los desencadenantes de la producción de leche,

La progesterona se produce en las glándulas suprarrenales, las gónadas específicamente después de la ovulación en el cuerpo lúteo) en el cerebro y durante el embarazo en la placenta.

La progesterona es necesaria para la conversión del endometrio en la fase secretora para preparar el útero para su implantación. Si no ocurre el embarazo los niveles de progesterona disminuyen dando lugar en los seres humanos, el periodo menstrual la progesterona pertenece al grupo de neuroesteroides, que están presentes en ciertas aéreas del cerebro, la progesterona está implicada en la función sináptica, tiene efectos neuroprotectores y afecta al proceso de mielinización. La progesterona tiene muchos efectos fuera del sistema reproductivo. Es termogénica, reduce los espasmos y relaja el músculo liso. Los bronquios se dilatan y regula la secreción de moco. La progesterona es un agente anti-inflamatorio y regula la respuesta inmunitaria. Está involucrada en la función tiroidea y en la osteogenesis. La medición de las

concentraciones de progesterona en el suero de utiliza en la evaluación de la función ovárica (34).

2.2.8.2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

La progesterona (antígeno) de la muestra compete con la progesterona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, conjugado) por la unión de anticuerpo anti-progesterona adsorbido en la microplaca (fase solida). Después de la incubación la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de antígeno marcado y, por lo tanto, inversamente proporcional a la concentración de 17OH Progesterona presente en la muestra. La concentración de 17OH Progesterona en la muestra se calcula tomando como base una curva estándar

2.2.8.3 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0 REF DCE002/0406-0

CAL1 REF DCE002/0407-0

CAL2 REF DCE002/0408-0

CAL3 REF DCE002/0409-0

CAL4 REF DCE002/0410-0

2. Control (1 frasco, 1 mL,)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis) REF DCE045/0403-0

3. Conjugado (1 frasco, 22 mL) 17OH Progesterona conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) REF DCE002/0402-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible con anticuerpo anti 17OH Progesterona absorbido) REF DCE002/0403-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL) H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel) REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL) Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL) Tampón fosfato 0,2 M, Proclin < 0,0015% REF DCE054-0

2.2.8.4 REACTIVOS NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

Agua destilada

MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN AUXILIARES

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota Conservar todos los reactivos a 2÷8 °C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

ADVERTENCIAS

Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.

Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.

Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.

Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos antiVIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o Proclin 300R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.

La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.

El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.

La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

Evite la exposición de los reactivos TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

Este método permite determinar concentraciones de 17OH Progesterona de 0,2 ng/mL a 20 ng/mL.

El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de 17OH Progesterona.

PRECAUCIONES

Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.

Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.

Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.

Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.

Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.

Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.

Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.

Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.

No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.

Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto, no debe tocarse el fondo de los pocillos.

PROCEDIMIENTO

Preparación de los Calibradores (C0...C4) Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de 17OH Progesterona:

	C0	C1	C2	C3	C4
ng/ml	0	0.2	1	8	40

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos se mantienen estables durante 6 meses a 2-8°C.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La determinación de la Progesterona puede realizarse en plasma o suero humano.

Si la dosificación no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

El control está listo para usar.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LAVADO

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la solución de lavado conc. 10X con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales con el lavado del frasco y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

PROCEDIMIENTO

Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos. Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.

Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.

Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C0-C5), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

<p>Incubar 1 h a +37 °C.</p> <p>Retirar el contenido de cada pocillo.</p> <p>lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar 15 minutos a temperatura ambiente 22-28 °C, protegida de la luz.</p>			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitar Suavemente La Placa</p> <p>Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.</p>			

RECATIVO	CALIBRADOR	MUESTRA/ CONTROL	BLANCO
CALIBRADOR C0-C4	20µL		

MUESTRA/ CONTROL		20µL	
CONJUGADO	200 µL	200µL	

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de 17OH Progesterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados.

Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad.

Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. En este caso, se recomienda usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

RESULTADOS

Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C0-C4) y de cada muestra.

Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada calibrador (C0-C5) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los calibradores (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones séricas o plasmáticas están incluidas en los siguientes intervalos:

		ng/mL	
HOMBRES		< 1,0	
MUJERES	fase folicular	0,1 – 1,4	
	fase lútea	4,0-25,0	
	Menopausia	< 1,0	
	EMBARAZO	SEMANA	
		18-21	53-76
		22-25	60-86
		26-29	71-133
		30-33	86-142
34-37		104-175	
38-41	117-187		

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio.

Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

PRECISIÓN

Intraensayo La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 4\%$.

Interensayo La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 9.3\%$.

Exactitud La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 1 -2- 4-8 ng/mL de Progesterona ha dado un valor medio (\pm SD) de $100.88\% \pm 8.29\%$. Para la dilución de ensayo se diluyeron 3 muestras diferentes 2, 4 y 8 veces con calibrador 0; el valor medio (\pm SD) obtenido es $95,31\% \pm 4,88\%$.

Sensibilidad La concentración mínima de Progesterona que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,05 ng/mL con un límite de confianza del 95%. 1

Especificidad El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Progesterona	100%
Testosterona	0,37%
17 α OH progesterona	0,29%
17b Estradiol	0,0013%
Estrona	0,00053%
Estriol	< 0,0001%
Cortisol	<0,0001%

La progesterona es la única hormona que en el embarazo necesita ser dosificada para mantener el embarazo. La progesterona se ha utilizado en un intento de prevenir el aborto involuntario, las amenazas de aborto y el parto prematuro. Sin embargo, los mecanismos por los que esta hormona contribuye al mantenimiento de la gestación pueden ser diferentes en el primer, segundo y tercer trimestre. Además de sus efectos endocrinos juega un papel inmuno modulador. Varios estudios han demostrado que la proliferación de linfocitos bloques de progesterona mito-gen-estimulante, prolonga la supervivencia del aloinjerto (38), modula la producción de anticuerpos, disminuye

la explosión oxidativa de los monocitos, reduce la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos en respuesta a productos bacterianos y altera la secreción de citoquinas de las células T. Modula también a los clones que favorecen la producción de IL-10.

2.2.9. LOS EFECTOS DE LA PROGESTERONA DURANTE EL EMBARAZO

La progesterona es necesaria tanto para el establecimiento y el mantenimiento del embarazo. Se necesita esta hormona para preparar el endometrio para la implantación, y además, para la transformación decidual después de la implantación ha tenido lugar.

Más tarde, la progesterona juega un papel en el control de la contractilidad del miometrio, y a través de su propiedad inmuno-modulación regula la relación inmunológica feto-materna durante el embarazo.

2.2.10 EFECTOS ENDOCRINOS DE PROGESTERONA

Durante la fase lútea del ciclo menstrual, la progesterona se produce por el cuerpo lúteo y una vez establecido el embarazo, el trofoblasto se convierte en la fuente principal de esta hormona. La progesterona induce la proliferación y diferenciación de las células del estroma (39) y se prepara el endometrio para la implantación. La progesterona actúa sobre el endometrio a través de receptores específicos que son miembros de la superfamilia de receptores nucleares y son regulados por estrógenos.

Los receptores intracelulares, receptor de progesterona A (PR-A) y B del receptor de progesterona (PR-B) son los productos de un mismo gen se transcribe bajo el control de dos promotores diferentes. La diferencia entre las dos isoformas es que PR-B contiene un tramo N-terminal adicional de aproximadamente 165 aminoácidos.

La expresión espacial y temporal de la PR-A y PR-B varía en los tejidos reproductivos como consecuencia del desarrollo y el estado hormonal. El mecanismo por el cual los controles de progesterona decidualización, no se entiende bien. Nuevas pruebas indican que los factores expresados localmente y la activación de la vía de segundo mensajero AMPc se integran en entradas hormonales y confieren

especificidad celular a la acción de la progesterona a través de la inducción de diversos factores de transcripción capaces de modular la función de PR. (35)

Csapo postula que la contractilidad del miometrio se controla mediante el equilibrio de dos principales reguladores endógenos que ejercen efectos opuestos. La contractilidad se incrementa por las prostaglandinas, y se inhibe por la progesterona. (37)

La progesterona se une al calcio y por lo tanto aumenta el umbral de excitabilidad del miometrio, mientras que la prostaglandina ejerce el efecto contrario, cuando la progesterona es ausente.

2.2.11 EFECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA PROGESTERONA

El embarazo es un modelo natural de una regulación inmune óptima en una relación de injerto-huésped. Con el fin de satisfacer intereses contradictorios de la madre y el feto, se establece un equilibrio para proteger a la madre de las infecciones y los tumores y al mismo tiempo para evitar un ataque inmunológico hacia el feto semi-alogénico. Durante la síntesis normal de embarazo el nivel de inmunoglobulina se aumenta (40) (41) (42) (34), mientras que las respuestas mediadas por células se reducen (36) (43) (44) por lo tanto la respuesta inmune materna está sesgada hacia la inmunidad humoral.

Las citoquinas Th1 que promueven respuestas mediadas por células más fuertes han sido demostrado que ejercen un efecto perjudicial sobre el embarazo en ratones. El IFN gamma activa las células T citotóxicas y células NK, que pueden dañar al trofoblasto. También inhibe la producción de GM-CSF, así como la proliferación de las células Th2 y, por consiguiente maduración de las células B y la síntesis de inmunoglobulinas. Las dosis bajas de IFN gamma retardar el desarrollo intrauterino en ratones, mientras que la administración de altas dosis dan como resultado el aborto (45).

El TNF-alfa inhibe la proliferación de células del trofoblasto in vitro. La inyección de murina recombinante o TNF humano a ratones en periodo de gestación resulta en aborto involuntario, mientras que los anticuerpos anti TNF o los antagonistas de TNF normalizan las altas tasas de resorción en apareamientos de aborto. (45)

Las citocinas Th2 desempeñan un papel protector potencial en la relación materno-fetal. IL-10 inhibe la producción de citoquinas Th1 y estimula la proliferación de células B. La falta de IL-10 da como resultado el fracaso del embarazo. Los ratones con la presencia de genes knock out moduladores de IL-10 nacen con peso significativamente menor que sus hermanos heterocigotos. Esto se puede prevenir mediante la administración de rIL-10 o anti TNF. (46)

Los factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) se ha identificado como un mediador potencialmente importante de la comunicación intercelular en el tracto reproductor femenino, con principales células diana siendo el embrión de preimplantación, y las células del trofoblasto de la placenta en desarrollo. (47) (48)

En los seres humanos hay una relación bien establecida entre el patrón de citoquinas periféricas y el resultado del embarazo (49). Se ha sugerido que el aumento de forma significativa de la expresión de citoquinas Th1 podría representar el fenómeno subyacente que conduce a fallos en la reproducción. (50) Además, la activación de las células mononucleares de sangre periférica con antígenos trofoblásticos (51) o mitógenos (52) confirmó que las mujeres con pérdida espontánea del embarazo recurrente idiopático muestran un perfil de tipo Th1 de citoquinas, que se caracteriza por la producción de IL-2, TNF e interferón gamma. (51)

Un creciente cuerpo de evidencia sugiere que la progesterona podría desempeñar un papel importante en el establecimiento de un entorno inmune adecuada para las primeras etapas del embarazo. (53) (54) (26) (55)

La progesterona en concentraciones comparables a los presentes en la interfase materno-fetal durante el embarazo, es un potente inductor de citoquinas de tipo Th2 (es decir, IL-4 e IL-5) (53), y también de LIF y la producción de M-CSF por T linfocitos (56) (57), por lo tanto la progesterona presentes en el microambiente de las células T deciduales podrían ser responsables, al menos en parte, para la producción de citoquinas Th2 de sesgo de por estas células (58).

Además de su efecto directo sobre las células T deciduales, la progesterona también actúa sobre el perfil de citoquinas a través de un mediador. Tras el reconocimiento de antígenos fetales, células T activadas periférica gamma / delta maternas expresan los

receptores de progesterona (59), y sobre P de unión, producirá la de un mediador; llamado PIBF (31), que induce una producción de citoquinas Th2 dominante y a través de la producción de citoquinas alterado inhibe NK mediada por el asesinato de un modo indirecto (60).

La actividad en ratones en proceso de gestación por el anticuerpo específico anti-PIBF provoca una reducción significativa en el número de fetos viables, y esto se asocia con un aumento de la actividad NK esplénica, junto con la reducción de IL-10 y el aumento de la producción de interferón γ y de las células del bazo (61). Estos efectos se invierten por el tratamiento de los animales en gestación con anticuerpos anti-NK (60). Estos datos sugieren que en los ratones PIBF contribuye al éxito del embarazo y que la mayor parte de su efecto por el embarazo de protección se encuentra en el control de la actividad NK.

Durante el embarazo una población de células NK única llamado uterine-NK, contienen gránulos citotóxicos (62), y entre los genes selectivamente son proteínas con actividad inmunosupresora conocida (63) secretadas sobre-expresado en decidual NK.

Las células deciduales NK secretan factores angiogénicos e inducen el crecimiento vascular en la decidua. Estos hallazgos, junto con su dinámica de la aparición sugieren que una de sus funciones podría ser el control de la placentación. Un estudio reciente (64) mostró que las células NK deciduales regulan la invasión del trofoblasto por la producción de la interleucina-8 y de interferón-inducible proteína-10 quimiocinas. Por otro lado, la perforina y granzimas también son expresados por NK decidual, (65) lo que sugiere que bajo ciertas condiciones la otra manera pacífica decidual NK puede llegar a ser citotóxicos.

Entre las células inmunitarias deciduales, las células dendríticas (DC) juegan un papel clave. En ratones la pérdida del embarazo se acompaña de una mayor presencia de las CD maduras deciduales (66), que a través de la producción de IL-12 podría aumentar la actividad de las células NK. La progesterona inhibe de forma mediada por el receptor la producción de citoquinas pro-inflamatorias por DC maduras (67).

El papel de la actividad de las células NK en el proceso reproductivo ha recibido mucha atención. La actividad NK se demostró para mostrar efectos nocivos en el desarrollo fetal, dando como resultado aborto espontáneo en ratones (50). En los ratones hay evidencia directa de la implicación de alta actividad de NK en la terminación del embarazo.

La infiltración de células NK se demostró en fetos de ratones dañados y placentas. La transferencia de células de bazo de actividad alta NK a ratones en gestación les induce al aborto (51).

El embarazo humano normal se caracteriza por una baja actividad NK periférica (52) y el aumento de la actividad NK parece ser un atributo de abortos espontáneos de etiología desconocida. En humanos, es difícil demostrar una relación directa entre la interrupción del embarazo espontáneo y la actividad NK, sin embargo, en varios estudios, se observó un aumento de actividad NK en asociación con diferentes formas de terminación del embarazo espontáneo.

Algunos argumentan que, dado que no hay evidencia de la asociación entre los niveles de las células NK en sangre periférica y en la mucosa uterina, las pruebas de recuento de células NK periférica o actividad no tiene ninguna relevancia.

La disponibilidad de estudios de placentas humanas normales se limita al primer trimestre, durante un embarazo humano normal en curso es difícil probar simultáneamente la presencia de células NK periféricas y en la decidua. Hay sólo unos pocos estudios que comparan las células NK periféricas y deciduales del mismo paciente. Lewis et al. (71) Mostraron que de manera similar a las células NK de sangre periférica, las células NK deciduales expresan los receptores de citotoxicidad natural de NKp30 y NKp46 pero la importancia de esto no será evidente hasta que se han identificado ligandos para estas moléculas. Gulan et al. (72) demostraron disminución del contenido de perforina de linfocitos deciduales de embarazos fallidos, en comparación con los de embarazos normales, lo que sugiere que una mayor tasa de desgranulación había tenido lugar en el primer caso. Al principio del embarazo células las NK de sangre periférica de IL-10 productoras fueron significativamente más frecuentes en comparación con los de las mujeres no embarazadas, y esta población celular se redujo en mujeres con aborto involuntario.

Higuma Myojo et al., (73) identifica las principales poblaciones de células NK en decidua normal, ya que las células de tipo NK3 TGF-beta productoras. Este tipo de células se redujo significativamente en decidua de mujeres con aborto involuntario recurrente. Los datos de Olivares et al. (33) Apoyar la hipótesis de que activan los linfocitos deciduales participan en el aborto espontáneo humana mediante la inducción de la apoptosis, pero no la necrosis del trofoblasto.

El valor de los resultados mediante la investigación de las placentas de abortos involuntarios espontáneos o partos prematuros es cuestionable. Estas muestras son susceptibles de contener artefactos y no es claro si los cambios observados son la causa o la consecuencia de aborto involuntario. Los resultados de los experimentos con animales no pueden extrapolarse directamente a la situación humana. Por lo tanto, es difícil de decir, cómo los cambios de que se dispone en la periferia se relacionan con los eventos locales.

2.2.12 PROGESTERONA EN EL EMBARAZO PRETERMINO Y EN AMENAZA DE ABORTO

La amenaza de aborto, la condición clínica más frecuente entre las mujeres en el embarazo de primer trimestre, afecta hasta un 15-20% de las mujeres embarazadas. La amenaza de aborto se manifiesta por sangrado vaginal y / o contracciones uterinas, mientras que el cuello del útero está cerrado. Esta etapa puede terminar en aborto espontáneo en aproximadamente el 10-15% de los casos (74) (75) o, alternativamente, el embarazo puede continuar normalmente. Las mujeres con amenaza de aborto están en mayor riesgo de resultados adversos del embarazo (32). Un estudio multicéntrico prospectivo reveló, que el sangrado vaginal de primero trimestre es un factor de riesgo independiente para la restricción del crecimiento intrauterino (OR = 2,6), parto prematuro (OR = 3,0), ruptura prematura de membranas (OR = 3,2) y el desprendimiento de la placenta (OR = 3,6) (60). El riesgo de parto prematuro (76), así como un RN de menos de 1000 g después de la amenaza de aborto también se incrementan, OR = 4,43. (32)

En lo que se refiere a la patología subyacente, la amenaza de aborto forma un grupo muy heterogéneo. La edad es un factor de riesgo de aborto involuntario. (77)

2.2.13 EL ABORTO

Es la interrupción del embarazo antes de los 180 días de gestación, pudiendo ser espontáneo, natural, o provocado (78).

2.2.14. TIPOS DE ABORTO

Aborto Espontáneo

Se considera aborto espontáneo a la pérdida de la gestación antes de las 26 semanas, cuando el feto no está aún en condiciones de sobrevivir con garantías fuera del útero materno. Un aborto espontáneo ocurre cuando un embarazo termina de manera abrupta. Un 8 y 15 por ciento de los embarazos, según las fuentes, que se detectan terminan de esta manera, aunque un número importante y difícilmente valorable pasan desapercibidos. La mayoría de los abortos espontáneos, tanto conocidos como desconocidos, tiene lugar durante las primeras 12 semanas de embarazo y en muchos casos no requieren de ningún tipo de intervención médica ni quirúrgica. De igual forma también la inmensa mayoría de los abortos inducidos se dan antes de las 12 semanas (79).

Causas del Aborto Espontáneo:

Las alteraciones cromosómicas constituyen la causa más común de esta alteración. El aborto espontáneo recurrente (AER) ha sido definido como la verificación de 3 o más AE reconocidos clínicamente. Datos epidemiológicos indican que el riesgo de un nuevo aborto después de un AE (aborto espontáneo) es del 24%, pero asciende a un 40% después de 4 AE (abortos espontáneos) consecutivos. También se han propuesto como causa de AER (aborto espontáneo recurrente) las alteraciones de la arteria uterina. Entre los factores anatómicos adquiridos están las adherencias intrauterinas, los miomas, la adenomiosis, las cirugías tubarias y la endometriosis que es una enfermedad que ocurre cuando el tejido endometrial, es decir, el tejido que reviste internamente el útero y que se expulsa durante la menstruación, crece fuera de él. En el caso de los miomas, se dice que su asociación con los AER (aborto espontáneo recurrente) puede obedecer a factores mecánicos, tales como reducción de la cantidad de sangre que se irriga, alteraciones de la placenta y contracciones uterinas que determinan la expulsión fetal. Se cree que el AER (aborto espontáneo recurrente)

en mujeres con endometriosis puede deberse a la secreción de toxinas o a una mayor producción de prostaglandinas, que generan contracciones uterinas y alteraciones hormonales. Sin embargo, no se sabe si el aborto es ocasionado por la endometriosis o por mecanismos inmunológicos indirectos. Los problemas de salud de la madre pueden ser las causas de un aborto. Fumar, consumir alcohol, los traumas y el abuso en el consumo de drogas, aumentan las posibilidades de un aborto (80).

Aborto Inducido

El aborto inducido, según la definición de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) es el como el resultante de maniobras practicadas deliberadamente con ánimo de interrumpir el embarazo. Las maniobras pueden ser realizadas por la propia embarazada o por otra persona por encargo de esta. Desde las primeras leyes a principios del siglo pasado, el aborto provocado ha ido siendo despenalizado en muchos países, tanto del primer, segundo o tercer mundo y su despenalización ha supuesto en estos países una disminución drástica de la morbilidad y mortalidad materna (13).

2.3 HIPOTESIS

Ho: Los niveles de Progesterona en Mujeres Embarazadas no tienen relación con el Aborto en el Primer Trimestre de Gestación.

Ha: Los niveles de Progesterona en Mujeres Embarazadas tienen relación con el Aborto en el Primer Trimestre de Gestación.

2.4 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES

2.4.1 VARIABLE DEPENDIENTE:

El Aborto

2.4.2 VARIABLE INDEPENDIENTE:

Determinación de Progesterona en Mujeres Embarazadas

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

3.1.1 INVESTIGACIÓN ANALÍTICA

El presente estudio es de tipo correlacional, prospectivo transversal, que se ubica en el nivel analítico que no realiza intervención, de carácter observacional, donde se buscó la causalidad de la amenaza de aborto y el aborto a partir de la determinación de los niveles de progesterona en las mujeres gestantes que cursan el primer trimestre de embarazo.

3.1.2 ENFOQUE

La presente investigación se enmarca en el paradigma Cuantitativo porque nos proporcionó resultados numéricos que fueron obtenidos en el laboratorio clínico particular Omega.

3.1.3 MODALIDAD BASICA DE LA INVESTIGACION

DE LABORATORIO: Porque se realizó los exámenes de progesterona en el laboratorio clínico OMEGA en el Equipo Stat Fax 4700 con el método ELISA (determinación inmunoenzimática directa de Progesterona en suero)

DOCUMENTAL: La investigación se realizó gracias al apoyo de fuentes bibliográficas como libros de diferentes autores, revistas, artículos científicos adquiridos del internet para poder ampliar el conocimiento y profundizar la investigación comprobando hipótesis.

DE CAMPO: la investigación se realizó en el Laboratorio Clínico particular Omega obteniendo muestras de sangre de pacientes que acudían al Hospital Docente Ambato que cursaban el primer trimestre de gestación, las muestras se procesaron en el laboratorio mencionado en el área química sanguínea con el objetivo de determinar los niveles de progesterona.

3.2 SELECCIÓN DEL ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO:

DELIMITACIÓN TEMPORAL

Este estudio se realizó en el periodo Diciembre - Junio 2016

DELIMITACION ESPACIAL

La investigación se encuentra en el área del conocimiento de la Salud y servicios sociales, en el sub área de Medicina según la clasificación de la UNESCO, y pertenece a las líneas investigativas de Salud materno – infantil y la de Epidemiología y salud pública.

La investigación está comprendida en el Hospital Docente Ambato en el área de emergencia, a pacientes que acudieron con síntomas de embarazo, y sangrados vaginales.

Las muestras de dichos pacientes e proceso en el laboratorio clínico Omega en el equipo stat fax 4700 con el método ELISA .

3.3 POBLACIÓN:

El estudio se realizó en el Hospital Docente Ambato en el periodo comprendido entre los meses de diciembre a Junio del 2016.

Se incluyeron para el estudio 30 pacientes gestantes, que se encontraban cursando un embarazo de menos de 12 semanas (1er trimestre), distribuidos en dos grupos:

El primer grupo comprende 15 pacientes gestantes cuyo embarazo se complicó con hemorragia del primer trimestre catalogado al ingreso en el servicio de emergencia ginecología y obstetricia como amenazas de aborto de inicio espontáneo o aborto involuntario, que requirieron hospitalización.

Y el segundo grupo comprendido, 15 mujeres gestantes de curso normal, las que fueron pesquisadas durante su visita al hospital para el control periódico del proceso de gestación, en el servicio de consulta externa.

3.3.1 DISEÑO MUESTRAL:

Al tratarse de un estudio con una población pequeña se decidió trabajar con toda la población y para la selección de las participantes se empleó criterios de adherencia para determinar la muestra.

3.3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Que las participantes después de haber sido informadas sobre los objetivos y los resultados esperados den su consentimiento informado por escrito.
- Primer grupo: Pacientes embarazadas cursando gestaciones de 11 semanas o menos, con hemorragia de la primera mitad del embarazo, ingresadas al servicio con diagnóstico de amenaza de aborto o aborto involuntario, cuyos cuadros se hayan iniciado de manera espontánea.

- Segundo grupo: Pacientes gestantes con embarazos normales, cursando gestaciones de 9 semanas o menos y que no se encuentre con infección activa o cualquier complicación que atente con la continuidad del curso normal del embarazo.

3.3.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes con embarazos complicados con hemorragia de la primera mitad, que hayan sido provocados mediante medicación o maniobras abortivas.
- Pacientes con hemorragias de la primera mitad del embarazo catalogadas como patologías diferentes al aborto (molahidatiforme, embarazo ectópico, desprendimiento normo placentario).
- Mujeres gestantes con antecedentes de abortos recurrentes idiopáticos.
- Mujeres con antecedentes de lupus eritematoso sistémico, síndrome anti fosfolipídico o cualquier enfermedad del colágeno

3.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE INDEPENDIENTE: Aborto

Tabla N° 1 Variable Independiente

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems	Técnicas	Instrumentos
Interrupción del embarazo que se produce en las primeras 20 semanas de embarazo.	<ul style="list-style-type: none">• Grupo caso• Grupo control	<ul style="list-style-type: none">• Aborto en curso• Embarazo normal	Semana gestacional? Tiene antecedentes patológicos en el embarazo?	Observación.	Registro e informes.

Elaborado: La Investigadora

VARIABLE DEPENDIENTE: Determinación de Progesterona en Mujeres Embarazadas.

Tabla N° 2 Variable Dependiente

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems	Técnicas	Instrumentos
Hormona secretada por el cuerpo lúteo o cuerpo amarillo de los ovarios, con diversas funciones sobre todo en el proceso de gestación.	<ul style="list-style-type: none"> - Normal - Bajo 	<ul style="list-style-type: none"> - 11.2 a 90.0 ng/mL - >11.2 ng/mL 	<p>¿Cuál es el valor de progesterona sérica en el primer trimestre de embarazo?</p> <p>¿Se relaciona los niveles de Progesterona con el Aborto?</p>	observación	Resultados de Laboratorio.

Elaborado: La Investigadora

3.5 DESCRIPCIÓN DE LA INTERPRETACION Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN:

La presente investigación se realizó en el Hospital Docente Ambato y en el laboratorio clínico Omega en el periodo comprendido entre los meses de diciembre a junio del 2016.

Durante los meses de Enero, Febrero, Marzo se realizó la pesquisa de pacientes y el análisis, procesamiento y resultados en el mes de Abril Mayo y Junio del 2016.

Este trabajo se basó en la recopilación de información proporcionada por la paciente para lo cual seguí un esquema:

- Reconocimiento a las mujeres embarazadas requeridas para la investigación.
- edad gestacional calculada por fecha de última regla o cálculo ecográfico, partiendo de los datos de presencia o no de sangrado transvaginal se realizó la selección de los participantes de cada grupo.
- Se socializó el estudio y se solicitó que otorgue el consentimiento informado por escrito de la ejecución de dicha investigación y la prueba que se va a realizar.
- Las muestras se obtuvieron mediante punción venosa, a nivel de la vena cefálica del pliegue del codo, cuya toma se realizó al primer contacto con las pacientes, se recolecto 4 cc de sangre venosa en un tubo de ensayo estéril rotulado e identificado con los datos de la paciente remitiéndose posteriormente a un laboratorio externo.

PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION

- La determinación de las concentraciones de progesterona se realizó en el laboratorio particular “OMEGA” se analizó mediante la técnica ELISA (determinación inmunoenzimática directa de Progesterona en suero) en el equipo Stat Fax 4700 con un tiempo de procesamiento de tres en todas las muestras siendo los resultados expresados en ng/ml.

- Con los resultados se procedió a elaborar una base de datos donde se expresó los resultados obtenidos, y para el procesamiento y tratamiento estadístico se empleó una herramienta informática, en este caso fue el SPSS v.22 para Windows 10. Para el análisis descriptivo de las variables cualitativas se representó en porcentajes y para las variables cuantitativas se utilizó medidas de tendencia central y dispersión.
- Para la parte inferencial del tratamiento estadístico se empleó la prueba de t de student para correlacionar y realizar la comprobación de la hipótesis.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS:

La información obtenida de las pacientes tuvo absoluta confidencialidad. El presente estudio no representó ningún riesgo para las mujeres gestantes ni para el producto, no se vulneró ningún protocolo clínico y se socializó oportunamente los procedimientos y los potenciales riesgos que representaba el procedimiento invasivo para la obtención de la muestra de sangre venosa.

Se realizó la admisión de las pacientes al estudio luego de que ellas otorgaron libre y voluntariamente el consentimiento informado.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS:

Tabla N° 3 resultados

Numero de muestra	código	sexo	edad	Edad gestacional	Estado de Gestación	resultado del examen de progesterona ng/mL
1	001	F	24	4	Control	22,3
2	002	F	17	6	Control	39,0
3	003	F	22	7	Control	22,4
4	004	F	34	9	Control	43,4
5	005	F	34	3	Control	19,8
6	006	F	24	8	Control	45,3
7	007	F	35	8	Control	24,1
8	008	F	30	7	Control	31,5
9	009	F	19	7	Control	49,0
10	0010	F	27	8	Control	49,7
11	0011	F	18	10	Control	17,1
12	0012	F	18	6	Control	13,2
13	0013	F	22	6	Control	32,9
14	0014	F	37	10	Control	42,4
15	0015	F	20	9	Control	45,2
16	0016	F	37	4	Aborto	39,1
17	0017	F	19	9	Aborto	21,0
18	0018	F	27	8	Aborto	17,1
19	0019	F	34	5	Aborto	13,2
20	0020	F	37	5	Aborto	12,1
21	0021	F	17	3	Aborto	10,2
22	0022	F	32	9	Aborto	13,7
23	0023	F	23	9	Aborto	4
24	0024	F	20	6	Aborto	6,5
25	0025	F	33	3	Aborto	12,1
26	0026	F	16	6	Aborto	11,2
27	0027	F	32	8	Aborto	9,5
28	0028	F	19	4	Aborto	10,1
29	0029	F	35	10	Aborto	5
30	0030	F	21	9	Aborto	12,9

Elaborado: La Investigadora

- **Descripción de la Población en estudio:**

En total, las estimaciones de progesterona séricas se llevaron a cabo en 30 mujeres, de las cuales fueron catalogadas con embarazo de curso normal 15 (50%). La edad media de la población fue de $26,1 \pm 7,2$ años de edad con un rango de 16-37 años [Ver tabla 1 y Fig. 1]

Tabla N° 4. Estadísticos descriptivos de la edad de las mujeres gestantes.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
EDAD	30	16	37	26,10	7,284
N válido (por lista)	30				

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

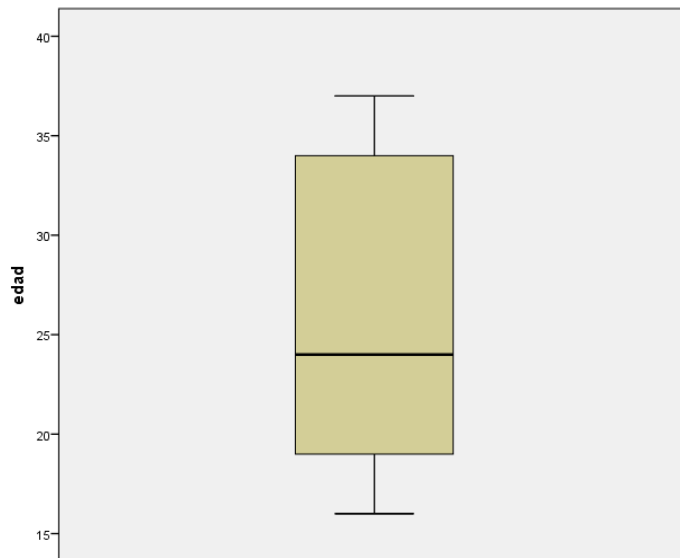


Gráfico N° 1 Distribución de la Edad en las mujeres gestantes del estudio.

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

El rango de edad que tuvo mayor frecuencia o la moda de la edad fue de 18 a 34 años de edad. [Ver Tabla 2 y Fig. 2]

Tabla N° 5. Rango de edades en las mujeres embarazadas

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	<18 años	3	10,0	10,0	10,0
	18-34 años	20	66,7	66,7	76,7
	>35 años	7	23,3	23,3	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

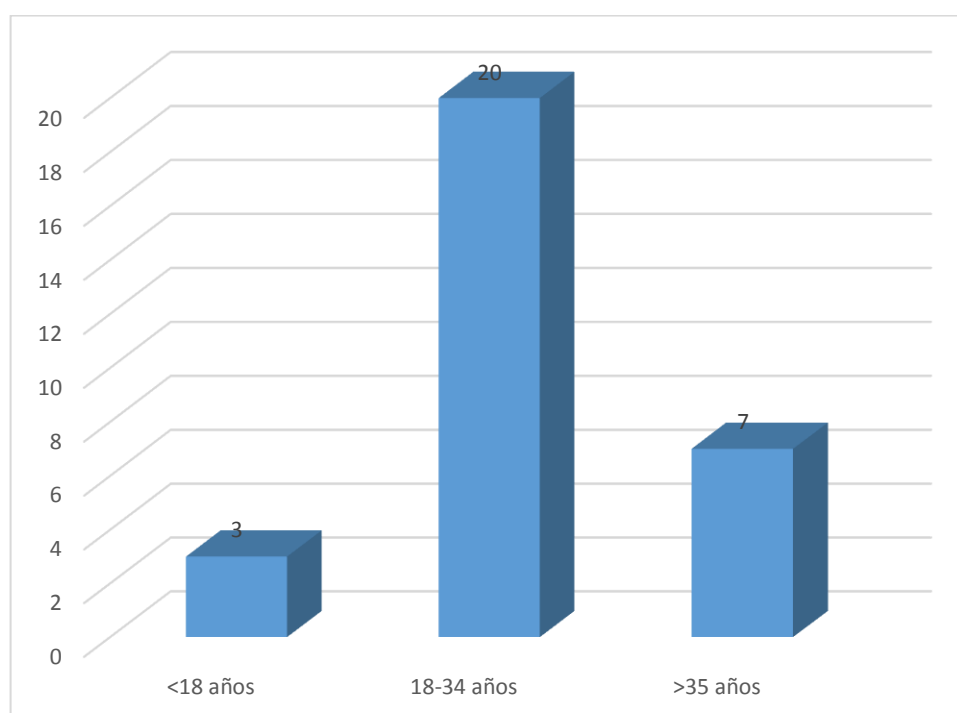


Gráfico N°2 : Distribución de los rangos de edad en las mujeres gestante

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

No existió diferencia entre el grupo de 18 a 34 años en cuanto a la presencia de aborto en ambos grupos presentaron 10 casos (66,7% de los casos por grupo); pero si se pudo apreciar que en el grupo de los adolescentes existió el doble de casos de aborto, y en menor proporción en el grupo de madres añosas (42,9% en el rango de la edad). [Ver Tabla 3 y Fig. 3]

		Tabla N° 6. Caso / Control					
		EMBARAZO NORMAL			ABORTO		
		Recuento	% del N de fila	% del N de columna	Recuento	% del N de fila	% del N de columna
Rango de edad	<18 años	1	33,3%	6,7%	2	66,7%	13,3%
	18-34 años	10	50,0%	66,7%	10	50,0%	66,7%
	>35 años	4	57,1%	26,7%	3	42,9%	20,0%

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

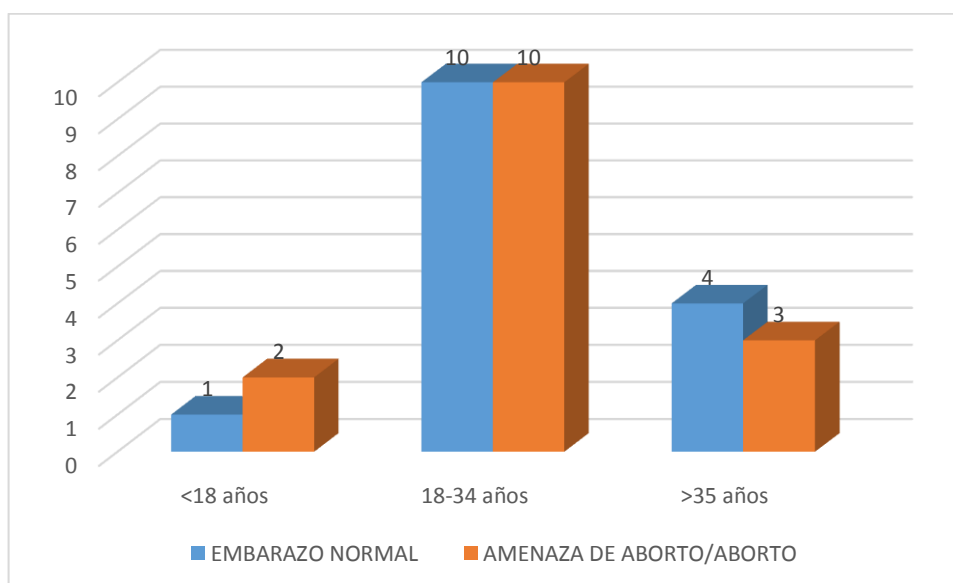


Gráfico N° 3. Amenaza de aborto y aborto en curso vs embarazo normal.

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

El promedio de edades entre ambos grupos fue de 25,4 para el grupo control y de 26,8 para el grupo de amenaza de aborto.

No se realizó un análisis de las condiciones sociodemográficas, como el estado civil, condición económica, lugar de residencia e instrucción. Tampoco se valoró antropometría de las mujeres gestantes.

En relación a la edad gestacional la media de esta variable en el estudio fue de 6,8 \pm 2,2 semanas de gestación con un rango de 3 – 10. [Ver Tabla 4 y Fig. 4]

Tabla N° 7. Estadísticos descriptivos de la Edad Gestacional.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
edad gestacional	30	3	10	6,87	2,224
N válido (por lista)	30				

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

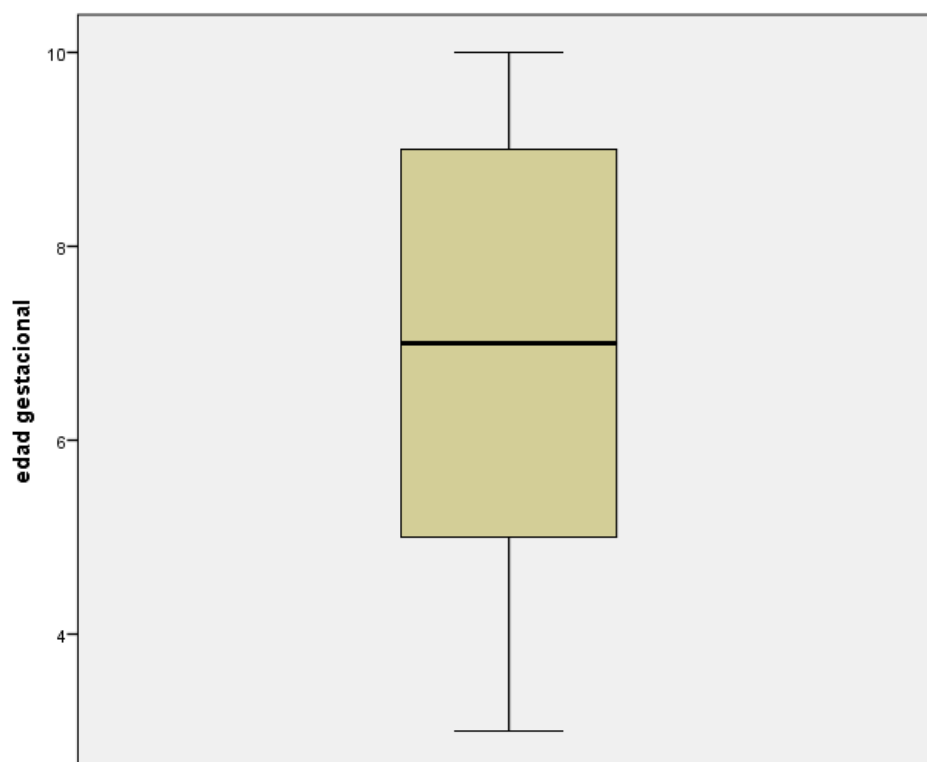


Gráfico N° 4 Distribución de la edad gestacional de la población en estudio.

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

Como se observa en la Fig. 4, la distribución es de tipo normal en la edad gestacional y el promedio es muy similar en ambos grupos, de 7,2 semanas de gestación en el grupo control y de 6,5 semanas en el grupo de amenaza de aborto. Cabe mencionar que en este estudio se descartaron las mujeres con antecedentes gineco-obstétricos de abortos previos y no se valoró el número de gestas, generalmente se trataba de mujeres en su primera gesta documentada.

- **Determinación de los niveles de progesterona en las Mujeres Embarazadas que cursan el primer trimestre de Gestación con un embarazo normal.**

Se analizaron las muestras de 15 mujeres que cursaban un embarazo normal en el primer trimestre de gestación, de las cuales se obtuvo que tenían un nivel medio de $13,2 \pm 8,37$ ng/ml.

Tabla N° 8. Estadísticos descriptivos de los niveles de Progesterona en Embarazo normal					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
EMBARAZO Normal	15	4,00	39,10	13,1800	8,37805

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

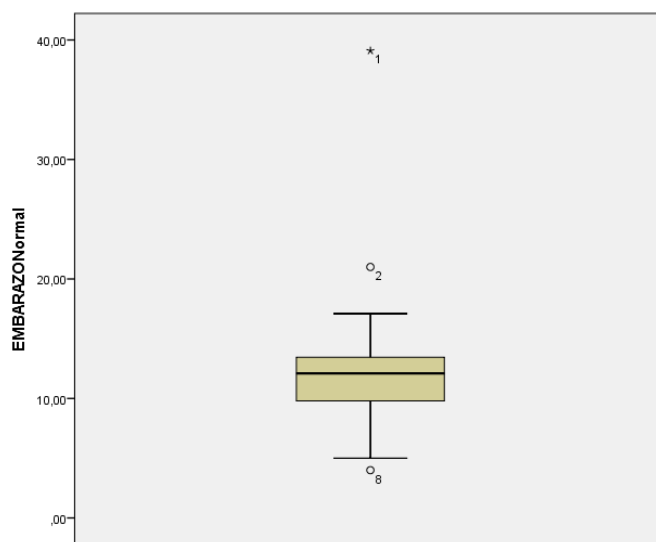


Gráfico N° 5. Niveles de Progesterona en Embarazo normal

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

- **Determinar los niveles de progesterona en las Mujeres Embarazadas que presentaron aborto involuntario.**

Tabla N° 9 Estadísticos descriptivos de los niveles de progesterona en Aborto					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
ABORTO	15	13,20	49,70	33,1533	12,52026

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

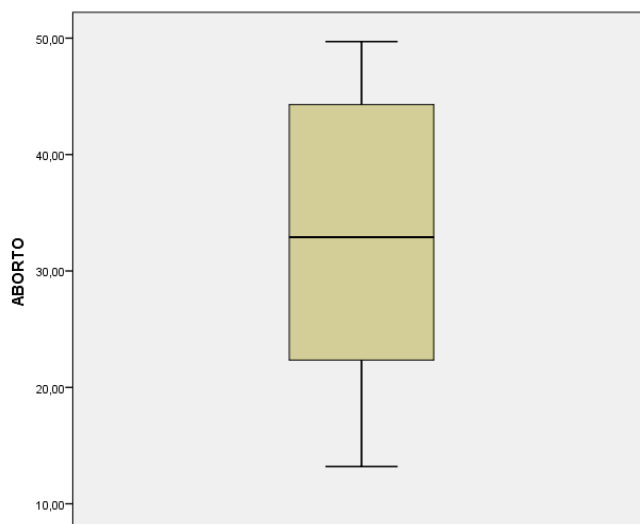


Gráfico N° 6 Estadísticos descriptivos de los niveles de progesterona en Aborto

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

- **Correlacionar los niveles de progesterona con el aborto en el primer trimestre de gestación de las mujeres que acuden a ser atendidas en el Hospital Docente Ambato.**

En cuanto a la relación de los niveles de Progesterona con la presencia de aborto o aborto en curso involuntario se encontró asociación estadísticamente significativa entre los valores ($p < 0,0001$); las pacientes que tienen valores bajos de progesterona tienen mayor riesgo de aborto ($OR = 1,6 - 2,5$ $IC = 95\%$). [Ver Tabla 5 y 6]

Tabla N° 10. Prueba t para comparación de niveles de progesterona con amenaza de aborto

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
nivel de progesterona	8,700	29	,000	23,1667	17,720	28,613
caso / control	5,385	29	,000	,500	,31	,69

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

Tabla N° 11. Estimación de riesgo para amenaza de aborto con los niveles de progesterona.

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Para cohorte categoria de progesterona = NORMAL	1,667	1,103	2,519
N de casos válidos	30		

Autora: Ma. Augusta Izurieta, 2016

4.2 CONCLUSIONES:

- Los embarazos con curso normal mantienen un nivel adecuado de Progesterona en el Primer trimestre de Gestación.
- En los embarazos que no se desarrollaron de forma satisfactoria (que se presentó aborto) los niveles de la progesterona tienden a ser bajos. Una reducción en la producción de hormonas por el cuerpo lúteo parece ser la causa del aborto. Esto ayudaría a indicar que la insuficiencia luteínica juega un papel crucial en el fracaso del embarazo.
- En conclusión, la medición de los niveles de progesterona en pacientes gestantes se debería hacer como una práctica rutinaria ya que las concentraciones de progesterona de las pacientes con aborto presentan un media de 8,2 ng/ml por debajo del rango considerado como normal para el primer trimestre de gestación (11ng/ml), mientras que el grupo control presentó una media de 18, Lo que demuestra en el presente estudio que las mediciones de progesterona en las complicaciones del primer trimestre de embarazo puede facilitar el diagnóstico de un embarazo no viable, incluyendo inminente aborto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFÍA

1. A. King, T.M. Burrows, S. Verma, S. Hiby, Y.W. Loke: Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* 4, 480-485 (2008). (62)
2. A.I. Csapo: The see-saw theory of parturition. *Ciba Found Symp* 47, 159–210 (1997). (37)
3. B. Gellersen, J. Brosens. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J. Endocrinol.* 178, 357-72 (2003). (35)
4. B. Polgar, E. Nagy, E. Miko, P. Varga, J. SzekeresBartho: Urinary PIBF (Progesterone Induced Blocking Factor) concentration is related to pregnancy outcome. *Biol Reprod* 71, 1699-70 (2004). (25)
5. B. Polgar, Gy Kispal, M. Lachmann, C. Paar, E. Nagy, P. Csere, E. Miko, L. Szereday, P. Varga, J. SzekeresBartho: Molecular cloning and immunological characterization of a novel cDNA coding for PIBF. *J Immunol* 171, 5956-5963 (2003). (31)
6. B.C. Choi, K. Polgar, L. Xiao, J.A. Hill: Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Suppl* 1, 46-59 (2010). (54)
7. B.J. Lewis, S. Croker, D.J. Newton, G.P. Lennon, P.M. Johnson, S.E. Christmas: Natural killer cell receptor expression by human first trimester decidual granular leukocytes and T-lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 48, 103-9 (2002). (71)
8. B.J. Luft, J.S. Remington: Effect of pregnancy on resistance to *Listeria*

- monocytogenes and *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Infect. Immun* 38, 1164-1171 (2012). .(34)
9. Beyens MN, Guy C, Ratrema M, y Ollagnier M. La prescripción de medicamentos para embarazadas en Francia: el estudio Himage. *Therapie* 2003; 58: 505-511. .(14)
 10. C. Everett, H. Ashurst, I. Chalmers: Reported management of threatened miscarriage by general practitioners in Wessex. *BMJ* 295, 583-6 (2007). (29)
 11. Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2005 ; 17 : 591-597. .(1)
 12. Comprobar JH. Un enfoque práctico para la prevención del aborto involuntario: Parte 1 - El tratamiento con progesterona. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2009; 36 (4): 203-8. . (7)
 13. D.A. Clark, G. Chaouat, R. Mogil, T.G. Wegmann: Prevention of spontaneous abortion in DBA/2-mated CBA/J mice by GM-CSF involves CD8+ T cell-dependent suppression of natural effector cell cytotoxicity against trophoblast target cells. *Cell Immunol* 154, 143. .(47)
 14. D.E. Dresser: The potentiating effect of pregnancy on humoral immune responses of mice. *J Reprod Immunol* 20, 253-266 (2001). .(44)
 15. Dawood MY: Circulating maternal serum progesterone in high-risk pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 125:832, 2006. .(78)
 16. Dodd JM, Flenady V, Cincotta R, Crowther CA (2006) Prenatal administration of progesterone for preventing preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 25(1):CD004947.(80)
 17. Donati S, G Baglio, Spinelli A, y Grandolfo ME. El consumo de drogas en el embarazo entre las mujeres italianas. *European Journal of Pharmacology* 2000; 56: 323-328. .(15)

18. E. Maggi, P. Parronchi, R. Manetti, C. Simonelli, M-P. Piccinni, F. Santoni-Rugiu, M. De Carli, M. Ricci, S. Romagnani: Reciprocal regulatory role of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148, 2142-2147(1). .(56)
19. E. Maggi: Production of IL-4 and leukemia inhibitory factor by T cells of the cumulus oophorus: a favorable microenvironment for pre-implantation embryo development. *Eur J Immunol* 31, 2431-7 (2011). .(58)
20. E.G. Olivares, R. Munoz, G. Tejerizo, M.J. Montes, F. Gomez-Molina, A.C. Abadia-Molina: Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67, 1211-7 (2002). .(33)
21. E.G. Olivares, R. Munoz, G. Tejerizo, M.J. Montes, F. Gomez-Molina, A.C. Abadia-Molina: Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 67, 1211-7 (2002). .(76)
22. E.R. Norwitz, D.J. Schust, S.J. Fischer: Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345, 1400-8 (2001). .(39)
23. F. Gucer, P. Balkanli-Kaplan, M. Yuksel, N.C. Sayin, M.A. Yuce and T. Yardim: Maternal serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-2 receptor in threatened abortion: a comparison with normal and pathologic pregnancies. *Fertil Steril* 76,. 707-711 (2001). .(23)
24. F.M. Basama and F. Crosfill: The outcome of pregnancies in 182 women with threatened miscarriage. *Arch Gynecol Obstet* 270, 86-90 (2004). .(75)
25. Ford HB Schust DJ. pérdida recurrente del embarazo: etiología, diagnóstico y terapia. *Rev Obstet Gynecol.* 2009; 2 (2): 76-83. .(4)
26. G. Chaouat, E. Menu, R. Kinsky, M. Dy, M. Minkowsky, G. Delage, M.N. Thang, D.A. Clark, T.G. Wegmann, J. Szekeres-Bartho: Lymphokines and nonspecific cellular lytic effectors at the feto-maternal interface affect

- placental size and survival. In: Reproductive Immunology 1989 (Eds. L. Mettler and D. Billington Elsevier) pp 283- 87 (2000). (45)
27. G. Gulan, E.R. Podack, D. Rukavina, L. Gudelj, G. Rubesa, O. Petrovic: Perforin-expressing lymphocytes in peripheral blood and decidua of human first-trimester pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 38, 9-18 (2007). (72)
28. Goldstein P , Berrier J , Rosen S , Sacks SA , Chalmers TC. Un meta-análisis de ensayos controlados aleatorios de los progestágenos en el embarazo. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 2009 ; 96 : 265 - 74. (19)
29. H. Minkoff, D. Nanda, R. Menez, S. Fikrig: Pregnancies resulting in infants with aquired immunodeficiency syndrome or AIDS related complex: follow-up of mothers, children and subsequently born siblings. *Obstet Gynecol* 69, 288-291 (2007). (41)
30. H.M. Shiu, D. Schottenfeld, B. McLean, J.G Fortner: Adverse effect of pregnancy on melanoma. *Cancer* 37, 181-187 (2006). (36)
31. Haas, DM y Ramsey, PS Progestágenos para prevenir el aborto involuntario. *Cochrane Syst base de datos. Rev.* 2008 ; : CD003511. (18)
32. I. Moriyama and T. Sugawa: Progesterone facilitates implantation of xenogeneic cultured cells in hamster uterus. *Nature New Biol* 236, 150-2 (2012). (38)
33. J. Hanna, D. Goldman-Wohl, Y. Hamani, I. Avraham, C. Greenfield, S. Nathanson-Yaron, D. Prus, L. CohenDaniel, T.I. Arnon, I. Manaster, R. Gazit, V. Yutkin, D. Beaharroch, A. Porgador, E. Keshet, S. Yagel, O. Mandelboim: Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12, 1065-74 (2006). (64)
34. J. Johns and E. Jauniaux: Threatened miscarriage as a predictor of obstetric outcome. *Obstet Gynecol* 107, 845-50 (2006). (74)

35. J. Johns, J. Hyett, E. Jauniaux: Obstetric outcome after threatened miscarriage with and without a hematoma on ultrasound. *Obstet Gynecol* 102, 483-7 (2003). .(32)
36. J. Kalinka and M. Radwan: The impact of dydrogesterone supplementation on serum cytokine profile in women with threatened abortion. *Am J Reprod Immunol* 55, 115-121 (2006). .(22)
37. J. Kalinka, J. Szekeres-Bartho: The impact of dydrogesterone supplementation on hormonal profile and progesterone-induced blocking factor concentrations in women with threatened abortion. *Am J Reprod Immunol* 53, 166-71 (2005). .(26)
38. J. Szekeres -Bartho, Zs. Faust, P. Varga: Progesteroneinduced blocking factor (PIBF) in normal and pathological pregnancy. *Amer J Reprod Immunol* 34, 342-7 (1995). .(24)
39. J. Szekeres-Bartho, A. Barakonyi, E. Miko, B. Polgar, T. Palkovics: The role of gamma/delta T cells in the fetomaternal relationship. *Seminars in Immunology* 13, 229-233 (2001). .(59)
40. J. Szekeres-Bartho, G. Par, G. Dombay, Y.C. Smart, Z. Volgyi: The anti-abortion effect of PIBF in mice is manifested by modulating NK activity. *Cell Immunol* 177, 194-9 (2007). .(61)
41. J. Szekeres-Bartho, Zs. Faust, P. Varga, L. Szereday, K. Kelemen: The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Amer J Reprod Immunol* 35, 348-51 (2006). .(60)
42. J.H. Check, E. Check, E. Levin, A. Bollendorf, J. Locuniak: Miscarriage in first trimester according to the presence or absence of the progesterone-induced blocking factor at three to five weeks from conception in progesterone supplemented women. *Clin Exp. Obstet Gynecol* 32, 13-4 (2005). .(27)

43. J.L. Weiss, F.D. Malone, J. Vidaver, R.H. Ball, D.A. Nyberg, C.H. Comstock, G.D. Hankins, R.L. Berkowitz, S.J. Gross, F. Dugoff, I.E. Timor-Tritsch, M.E. D'Alton ME; FASTER Consortium: Threatened abortion: A risk for poor outcome, a population-based screening study: *Am J Obstet Gynecol* 190, 745-50 (2004). (77)
44. Kim JJ, Choi YM, Choung SH, Yoon SH, Lee GH, Luna SY. Estrogen receptor beta 1730 G / A polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Steril.* 2010; 93 (6): 1942-7. (10)
45. Kirsten D. Recurrent miscarriage. *BMJ Clin Evid.* 2011; 2011: 1409. (11)
46. L.A. Koopman, H.D. Kopcow, B. Rybalov B, J.E. Boyson, J.S. Orange, F. Schatz, R. Masch, C.J. Lockwood, A.D. Schachter, P.J. Park, J.L. Strominger. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 19. 8, 120112 (2003). (63)
47. L.J. Salomon, P. Rozenberg, J. Szekeres-Bartho, L. Malagrida, Y. Giudicelli Y. Ville: Changes in progesterone-induced-blocking-factor expression rates following mifepristone administration in termination of pregnancy at 5 to 8 weeks. *J Matern Fetal Neonat. Med* 17, 353-6 (2006). (28)
48. La mortalidad materna en Vietnam 2000-2001: un análisis en profundidad de las causas y factores determinantes. Manila: Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud para el Pacífico Occidental; 2005. (13)
49. M. Rahman, M. Li, P. Li, H. Wang, S.K. Dey, S.K. Das: Hoxa-10 deficiency alters region-specific gene expression and perturbs differentiation of natural killer cells during decidualization. *Dev Biol* 290, 105-17 (2006). (70)
50. M.C. Reinhardt: Effects of parasitic infections in pregnant women: *Ciba Found Symp* 77, 149-163 (2000). (42)
51. M.H. Omar, M.K. Mashita, P.S. Lim and M.A. Jaml: Dihydroprogesterone in threatened abortion: pregnancy outcome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95, 421-

425 (2005). .(30)

52. M.J. Van den Heuvel, S. Chantakru, X. Xumei, E.E. Evans, F. Tekpetey, P.A. Mote, C.L. Clarke, B.A. Croy: Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 34, 273-93 (2005). .(68)
53. M.R. Lichtenstein: Tuberculin reaction in tuberculosis during pregnancy. *Am Rev Tuberc Pulm Dis* 48, 89-93 (2002). .(43)
54. M.W. Varner: Autoimmune disorders in pregnancy. *Semin Perinatol* 15, 238-250 (2001). .(40)
55. M-P. Piccinni, M.G. Giudizi, R. Biagiotti, L. Beloni, L. Giannarini, S. Sampognaro S, P. Parronchi, R. Manetti, C. Livi, S. Romagnani, E. Maggi: Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both. IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cells clones. *J Immuno*, 155, 128-133 (2015). .(53)
56. Ogasawara, M., Kajiura, S., Katano, K., Aoyama, T., and Aoki, K. Are serum progesterone levels predictive of recurrent miscarriage in future pregnancies? *Fertil.Steril.* 2007 ; 68 : 806-809. .(17)
57. Palagianò A, Bulletti C, Pace MC, De Ziegler D, Cicinelli E, Izzo A (2004) Effects of vaginal progesterone on pain and uterine contractility in patients with threatened abortion before twelve weeks of pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 1034:200–210. .(79)
58. Paradisi R, Maldini-Casadei M, Boni P, Busacchi P, Porcu E, Venturoli S: T-helper 2-cytokine levels in women with threatened abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111, 43-49 (2003). .(20)
59. Porter TF, LaCoursiere Y, Scott JR. La inmunoterapia para el aborto involuntario recurrente. En: *La Cochrane Library*, Número 4, 2009.

Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. fecha Buscar 2005. .(12)

60. R. Kuhn, K. Rajewsky, W. Muller : IL-4 and IL-10 deficient mice. 8th Internatl. Congress of Immunology (Abstr.), 203 (2012). .(46)
61. R. Manetti, P. Parrochi, M.G. Giudizi, M-P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, S. Romagnani: Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th. cells. *J Exp Med* 177, 1199-1204 (2013). .(57)
62. R. Paradisi, E. Porcu, S. Venturoli, M. MaldiniCasadei, P. Boni: Maternal serum levels of proinflammatory cytokines in missed and threatened abortion. *Am J Reprod Immunol* 50, 302-8 (2003). .(21)
63. R. Raghupathy, E. Al Mutawa, M. Makhseed, F. Azizieh, J. Szekeres-Bartho: Modulation of Cytokine Production by Dydrogesterone in Lymphocytes from Women with Recurrent Abortion. *Brit J Ob Gyn* 112, 1096101 (2005). .(55)
64. R. Raghupathy, M. Makhseed, F. Azizieh, A. Omu, M. Gupta, R. Farhat: Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 15, 713-718 (2000). .(51)
65. R. Raghupathy, M. Makhseed, F. Azizieh, N. Hassan, M. Al-Azemi, E. Al-Shamali: Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell Immuno.* 196, 122-30 (2009). .(52)
66. R. Raghupathy: Th-1 type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunology Today* 18, 478-82 (1997). .(50)
67. Rai, R. and Regan, L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006; 368: 601–611. .(2)
68. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom y Berger R. La localización del gen del receptor de progesterona humano en el cromosoma 11q22-q23. *Hum Genet.* 2007; 77 (3): 280-2.. .(9)

69. S. Higuma-Myojo, Y. Sasaki, S. Miyazaki, M. Sakai, A. Siozaki, N. Miwa, S. Saito: Cytokine profile of natural killer cells in early human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 54, 21-29 (2005). .(73)
70. S.A. Robertson, G. Mayrhofer: Seamark, R.F. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod* 54, 183-96 (2006). .(48)
71. S.M. Blois, C.D. Alba Soto, M. Tometten, B.F. Klapp, R.A. Margni, P.C. Arck. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod* 2004; 70: 1018-1023. .(67)
72. S.M. Yie, R. Xiao, C.L. Librach: Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* 21, 2538-44 (2006). .(69)
73. Scarpin KM, JD Graham, PA Mote, CL Clarke. acción de la progesterona en los tejidos humanos: la regulación de la expresión del receptor de progesterona (PR) isoforma, posicionamiento nuclear y la expresión coregulator. *Nucl señal Recep.* 2009; 7: E009. .(8)
74. Szekeres-Bartho J, terapia Balasch J. Progestágeno de aborto involuntario recurrente. *Hum Reprod actualización.* 2008; 14 (1): 27-35. .(5)
75. T. Bogovic, T. Crncic, G. Laskarin, et al : Perforin and Fas/FasL cytolytic pathways at the maternal–fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 54, 241–248 (2005). .(65)
76. T.G. Wegmann, H. Lin, L. Guilbert, T.R. Mosmann: Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today* 14, 353-356 (2003). .(49)
77. Toth B, Jeschke N, N Rogenhofer Scholz C Würfel W, Thaler CJ, et al. aborto involuntario recurrente: conceptos actuales en el diagnóstico y tratamiento. *J*

Reprod Immunol. 2010; 85 (1): 25-32. .(6)

78. Toth, B., Jeschke, U., Rogenhofer, N., Scholz, C., Wurfel, W., Thaler, CJ, and Makrigiannakis, A. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. J. Reprod. Immunol. 2010 ; 85 : 25-32. .(3)
79. U. Kammerer: Antigen-presenting cells in the decidua. Chem Immunol Allergy, 89, 96-104, (2005). .(66)
80. Villar J, Gulmezoglu AM, Khanna J, Carroli G, Hofmeyr GJ, Schulz K, et al. la salud reproductiva basada en la evidencia en los países en desarrollo. La Biblioteca de Salud Reproductiva de la OMS, N° 8. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. .(16)

LINKOGRAFÍA:

Real Colegio de Obstetras y Ginecólogos. La gestión de aborto involuntario recurrente. [Http://www.rcog.org.uk/guidelines/recurrent.html](http://www.rcog.org.uk/guidelines/recurrent.html) (visitada 2001). .

BASE DE DATOS UTA:

PROQUEST: Aliño M, López J, Navarro R. Adolescencia. Aspectos generales y atención a la salud. Rev Cubana Med Gen Integr [Internet]. 2006; 22 (1). Disponible en: 73 http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-21252006000100009&script=sci_arttext&tlng=e

PROQUEST: Álvarez G, Cruz J, Garau A, Lens V. Infección urinaria y

embarazo, diagnóstico y terapéutica. Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina [Internet].2006; (155); 20-23 Disponible en: http://kinesio.med.unne.edu.ar/revista/revista155/6_155.htm

PROQUEST: Castro F, Labarrere Y, González G, Barrios Y. Factores de riesgo del Síndrome Dificultad Respiratoria de origen pulmonar en el recién nacido. Rev Cubana Enfermer [Internet]. 2007; 23. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03192007000300005&script=sci_arttext

PROQUEST: Nazer J, Cifuentes L, Rodríguez M, Rojas M. Malformaciones del sistema nervioso central en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile y maternidades chilenas participantes en el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC). Rev. méd. Chile [Internet]. 2001; 129. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001001000008

PROQUEST: Peláez J. Adolescente embarazada: características y riesgos. Rev Cubana Obstet Ginecol [Internet]. 2007; 23 (1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X1997000100003

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO



CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPACIÓN EN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TEMA: “DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN “

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

IZURIETA ESCOBAR MARIA AUGUSTA

INSTITUCIÓN DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO

HOSPITAL REGIONAL DE AMBATO

El propósito de esta ficha de consentimiento es brindar a los participantes de esta investigación una clara explicación de la naturaleza de la misma, así como de su rol en ella como participantes.

La presente investigación es conducida por María Augusta Izurieta Escobar, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Técnica de Ambato.

La meta de la investigación es el estudio de progesterona en mujeres embarazadas y su relación con el aborto en el primer trimestre de gestación,

La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Sus nombres serán codificados usando su número de historia clínica por lo tanto serán estrictamente confidencial.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él.

Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma. Desde ya agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente participar de esta investigación, conducida por Maria augusta Izurieta escobar.

He sido informado (a) que la meta de esta investigación es el determinar la progesterona en mujeres embarazadas y su relación con el aborto en el primer trimestre de gestación.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona.

De tener preguntas sobre mi participación en este estudio, puede contactar a Izurieta Maria Augusta al 0991400038

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando éste haya concluido.

.....
.....

Nombre del participante

Firma del participante

fecha

ANEXO N° 2: SOLICITUD Y AUTORIZACIÓN PARA EJECUCIÓN PRÁCTICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN HOSPITAL DOCENTE AMBATO



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Facultad de Ciencias de la Salud
Carrera de Laboratorio Clínico

Calles Salvador y México (Cda. Ingahurco) Telefax: 2521134 Ext. 113
 Ambato – Ecuador

Autorizado

Ambato, 09 de diciembre de 2015
 FCS- CLC- 885- 2015

Nro. TRAMITE	2592
FECHA:	10 DIC. 2015 <small>HORA: 12:29</small>
RESPONSABLE:	<i>Petty</i>
N° UNIDAD/SECCIÓN	

Doctor
 Carlos López
DIRECTOR DEL HOSPITAL PROVINCIAL DOCENTE AMBATO
 Presente.-

De mi consideración:

Por medio del presente le solicito de la manera más gentil se le conceda la apertura para ejecutar el proyecto de Investigación DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDEN A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO, bajo la autoría de la señorita IZURIETA ESCOBAR MARIA AUGUSTA estudiante del décimo Semestre de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Por la favorable atención que se sirva a la presente, le reitero mis más sinceros agradecimientos.

Atentamente,

Dr. Mg. Vicente Noriega Puga
 COORDINADOR LABORATORIO CLÍNICO

Elaborado por:	Siglas	Rúbrica	Fechas
MSS	MSS		09/12/2015
Revisado por	VNP		09/12/2015
Autorizado por	VNP		09/12/2015

*Proyecto
 10/11/2015
 Ambato*

ANEXO N° 3: SOLICITUD PARA EJECUCIÓN PRÁCTICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN LABORATORIO CLINICO PARTICULAR OMEGA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Facultad de Ciencias de la Salud
Carrera de Laboratorio Clínico

Calles Salvador y México (Cda. Ingahurco) Telefax: 2521134 Ext. 113
 Ambato – Ecuador

Ambato, 09 de diciembre de 2015
 FCS- CLC- 884- 2015

Licenciado
 Marcelo Terán
PROPIETARIO DEL LABORATORIO CLÍNICO OMEGA
 Presente.-

De mi consideración:

Por medio del presente le solicito de la manera más gentil se le conceda la apertura para ejecutar el proyecto de Investigación DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDEN A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO, bajo la autoría de la señorita IZURIETA ESCOBAR MARIA AUGUSTA estudiante del décimo Semestre de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Por la favorable atención que se sirva a la presente, le reitero mis más sinceros agradecimientos.

Atentamente,

Dr. Mg. Vicente Noriega Puga
 COORDINADOR LABORATORIO CLÍNICO



Lcd. Marcelo Terán
 LABORATORISTA CLÍNICO
 MSP L. 5 F. 98 No. 296

	Siglas	Rúbrica	Fechas
Elaborado por:	MSS	MSS	09/12/2015
Revisado por	VNP		09/12/2015
Autorizado por	VNP		09/12/2015

ANEXO N° 4: AUTORIZACIÓN PARA EJECUCIÓN PRÁCTICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN LABORATORIO CLINICO PARTICULAR OMEGA



**LABORATORIO CLÍNICO BACTERIOLÓGICO Y HORMONAL
"OMEGA"**

DIRECCIÓN: DARQUEA Y TOMAS SEVILLA ESQUINA
EDIFICIO FIALLOS SEGUNDO PISO
TELÉFONOS: 03 2824964 – EMERGENCIAS: 0992881133
Email: omegalab2012@hotmail.es

Ambato, 10 de Enero de 2016

El que suscribe, Lcdo. **César Marcelo Terán Galarza** con cédula de identidad **180375019-7**, propietario del Laboratorio Clínico **OMEGA**, ubicado en la ciudad de Ambato (en las calles, Darquea y Tomas Sevilla, esquina Edificio Fiallos).
A pedido de la señorita **MARÍA AUGUSTA IZURIETA ESCOBAR**, con cédula de identidad **180463447-3**, autorizo que realice el procesamiento de las muestras para su proyecto de investigación con el tema "**DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO**".

Es todo lo que puedo decir en honor a la verdad.

Atentamente:


Lcdo. Marcelo Terán
LABORATORISTA CLINICO
MSP L. 5 F. 98 No. 296

**ANEXO N° 5: HOJA DE INFORME TECNICO DEL EQUIPO DE ANALISIS
STAT FAX 4700**



AleSeb - Service

Paul Fernando Torres Tapia
RUC: 1714504642001

**INFORME TECNICO
ACTA ENTREGA - RECEPCION**

N.-00002093

Fecha: 04- FEBRERO - 2016

<p>DATOS GENERALES</p> <p>NOMBRE: LIC. ANIBAL TORRES</p> <p>AREA: LAB. CLINICO</p> <p>FECHA CONTRATO: 01- FEBRERO - 2016</p> <p>GARANTIA: CIUDAD: LIMA</p>	<p>DATOS TECNICOS DEL EQUIPO:</p> <p>EQUIPO: RECTOR DE MICROBIOS</p> <p>MARCA: STAT FAX</p> <p>MODELO: 4700</p> <p>SERIE: 1204</p>
<p>PROBLEMAS DEL EQUIPO:</p> <p>MANTENIMIENTO PREVENTIVO Y VERIFICACION</p>	
<p>TRABAJO REALIZADO:</p> <p>- REVISION GENERAL</p> <p>- REVISION DE BANCOS</p> <p>- PRUEBAS DE CONTROL</p>	
<p>REPUESTOS UTILIZADOS:</p> <p>.....</p>	
<p>OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES:</p> <p>- EL EQUIPO SE ENCUENTRA OPERATIVO</p>	
<p>NOMBRE TECNICO: PAUL TORRES</p>	<p>NOMBRE Y SELLO DEL PERSONAL DEL AREA: <i>Paul Fernando Torres Tapia</i></p>

ANEXO N° 6: TÉCNICA DE PROGESTERONA EQUIPO VECTOR DE MICROELISA.



DCM006-9
Ed. 01/2015

PROGESTERONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de Progesterona en suero o plasma humano

IVD



LOT
Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO006

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de Progesterona en suero y plasma. El kit Progesterone ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

Progesterona (C21) es una hormona esteroide que participan en el ciclo menstrual, el embarazo (apoyo a la gestación) y la embriogénesis de los seres humanos y otras especies.

La progesterona es importante para la síntesis de aldosterona (mineralocorticoides), y el 17-OH progesterone para la síntesis de cortisol (glucocorticoides). Los niveles de progesterona son relativamente bajos en los niños y en mujeres posmenopáusicas. Los hombres adultos tienen niveles similares a los de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual.

En las mujeres, los niveles de progesterona son relativamente bajas durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual, aumentan después de la ovulación y se elevan durante la fase lútea. En caso de embarazo, los niveles de progesterona son similares a los niveles en la fase lútea. Después del nacimiento y durante la lactancia, los niveles de progesterona son muy bajos. La caída en los niveles de progesterona después del parto es uno de los desencadenantes de la producción de leche.

La progesterona se produce en las glándulas suprarrenales, las gónadas (específicamente después de la ovulación en el cuerpo lúteo), en el cerebro y, durante el embarazo, en la placenta.

La progesterona es necesaria para la "conversión" del endometrio en la fase secretora para preparar el útero para su implantación. Si no ocurre el embarazo, los niveles de progesterona disminuyen dando lugar, en los seres humanos, el período menstrual.

La progesterona pertenece al grupo de neuroesteroides, que están presentes en ciertas áreas en el cerebro. La progesterona está implicada en la función sináptica, tiene efectos neuroprotectores y afecta el proceso de mielinización.

La progesterona tiene muchos efectos fuera del sistema reproductivo. Es termogénica, reduce los espasmos y relaja el músculo liso. Los bronquios se

dilatan y regula la secreción de moco. La progesterona es un agente anti-inflamatorio y regula la respuesta inmunitaria.

Está involucrada en la función tiroidea y en la osteogénesis.

La medición de las concentraciones de progesterona en el suero se utiliza en la evaluación de la función ovárica.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Progesterona (antígeno) de la muestra compete con la Progesterona antigénica marcada con peroxidasa de rábano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-Progesterona adsorbido en la microplaca (fase sólida). Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el Substrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se toma amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Progesterona en la muestra. La concentración de Progesterona en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/0606-0
CAL1	REF DCE002/0607-0
CAL2	REF DCE002/0608-0
CAL3	REF DCE002/0609-0
CAL4	REF DCE002/0610-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/0603-0

3. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

Progesterona conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/0602-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti Progesterona adsorbido en la microplaca

REF DCE002/0603-0

TÉCNICA DE PROGESTERONA EQUIPO VECTOR DE MICROELISA.

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel) **REF DCE004-0**
6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel) **REF DCE005-0**
7. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8°C.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de interrupción está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de Progesterona desde 0.2 hasta 40 ng/mL.
- Para concentraciones más altas (por ejemplo, embarazo) se recomienda diluir la muestra.
- El suministro de cortisona y de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de Progesterona.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los

reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.

- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validado.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Antes del uso mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio. Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de Progesterona:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0.2	1	8	40

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos,

TÉCNICA DE PROGESTERONA EQUIPO VECTOR DE MICROELISA.

los Calibrador permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2 Preparación de la muestra

La determinación de Progesterona se puede realizar en el plasma o suero humano.

Si la dosis no se llevó a cabo el mismo día de la recolección, mantener la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

El Control está listo para usar.

6.3 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la solución de lavado conc. 10X con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2+8 °C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4 Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos. Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	20 µL		
Muestra/ Control		20 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	

Incubar 1 h a 37°C.
Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida.

Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra

una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.

TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22+28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL

Agitar suavemente la placa.

Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de Progesterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C₀-C₄). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

TÉCNICA DE PROGESTERONA EQUIPO VECTOR DE MICROELISA.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de Progesterona en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

		ng/mL	
HOMBRES		< 1,0	
MUJERES:	fase folicular	0,1 - 1,4	
	fase medio-lútea	4,0 - 25,0	
	menopausia	< 1,0	
	embarazo	semana	
		18 - 21	53 - 76
		22 - 25	60 - 86
		26 - 29	71 - 133
30 - 33		86 - 142	
34 - 37	104 - 175		
38 - 41	117 - 187		

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (20x) dos niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es $\leq 4\%$.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (10x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es $\leq 9.3\%$.

10.2 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 1 - 2 - 4 - 8 ng/mL de Progesterona ha dado un valor medio (\pm SE) de $100.88\% \pm 8.29\%$.

10.3 Sensibilidad

La concentración mínima de Progesterona detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0.05 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4 Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según el método de Abraham:

Progesterona	100 %
Testosterona	0,37 %
17 α OH-progesterona	0,29 %
17 β Estradiol	0,0013 %
Estrona	0,00053 %
Estriol	< 0,0001 %
Cortisol	< 0,0001 %

10.5 Correlación

El Progesterona ELISA Diametra fue comparado con otro ensayo comercial de Progesterona (Adaltis). Se analizaron 31 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$(\text{Diametra}) = 0.97 * (\text{Adaltis}) + 0.04$$

$$r^2 = 0.887$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22 (8), 1255 (1976)
2. De Villa, G.O., et al J. Clin. Endoc. Metab. 35, 458 (1972)
3. Joyce, B.G., et al Steroids 29, no 6, 761, (1977)
4. Winkel P., et al Clin. Chem. 22 (4), 422 (1976)
5. Rajkowski K.N, et al Steroids 29, no 5 (1977)

Ed. 01/2015

DCM006-9

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

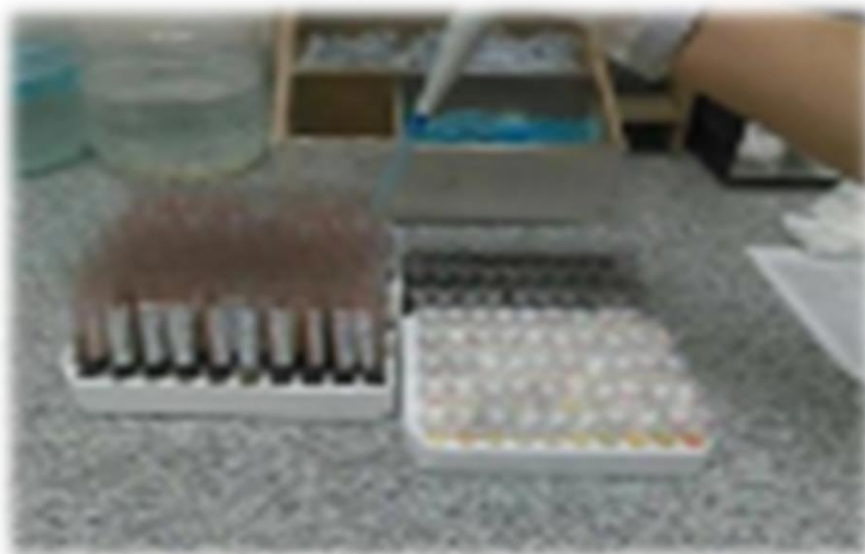
Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

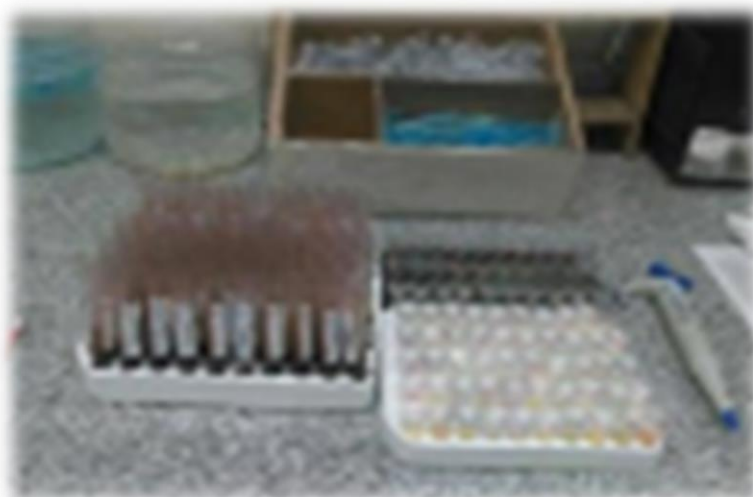
E-mail: info@diametra.com

ANEXO N° 7 FOTOGRAFIAS:

FOTOGRAFIA N° 1: MATERIALES Y REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA.



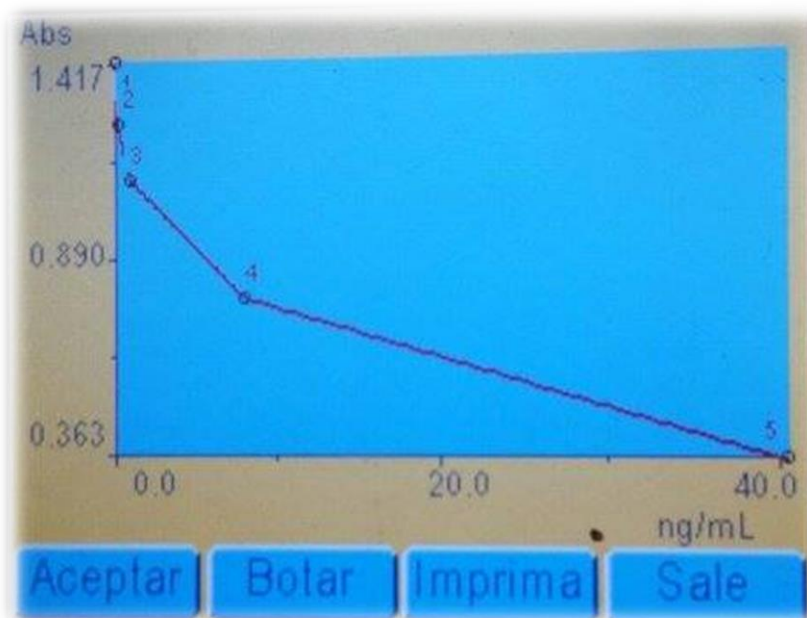
FOTOGRAFIA N° 2 SUEROS SEPARADOS PARA SU DETERMINACION



FOTOGRAFIA N° 3 INGRESO DE DATOS PARA LA DETERMINACION DE PROGESTERONA



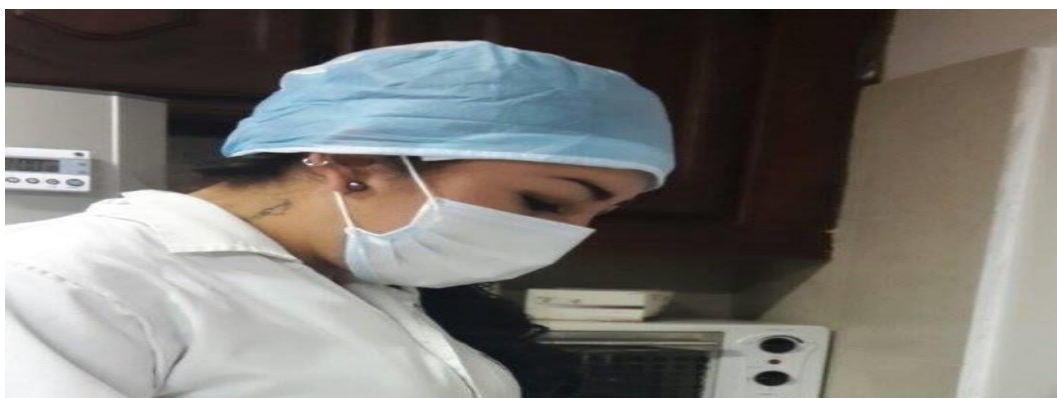
FOTOGRAFIA N° 4 CURVA DE CALIBRACION DEL EQUIPO STAF FAX 4700



FOTOGRAFIA N° 5 REACTIVOS Y CONTROLES DE PROGESTERONA



FOTOGRAFIA N° 6 PIPETEO DE LAS MUESTRAS EN CADA UNO DE LOS POSILLOS.



FOTOGRAFIA N° 7 INGRESO DE LOS POSILOS EN EL EQUIPO STAT FAX 47000.



FOTOGRAFIA N° 8 RESULTADOS



**ANEXO N° 8 CERTIFICADO DE EJECUCIÓN LABORATORIO CLINICO
PARTICULAR OMEGA**



**LABORATORIO CLÍNICO BACTERIOLÓGICO Y HORMONAL
"OMEGA"**

DIRECCIÓN: DARQUEA Y TOMAS SEVILLA ESQUINA
EDIFICIO FIALLOS SEGUNDO PISO
TELÉFONOS: 03 2824964 – EMERGENCIAS: 0992881133
Email: omegalab2012@hotmail.es

Ambato, 15 de Junio de 2016

CERTIFICADO

A petición verbal de la parte interesada, certifico que:

La Srta. **MARÍA AUGUSTA IZURIETA ESCOBAR**, con cédula de identidad **180463447-3** realizó la parte práctica de su proyecto de investigación en el Laboratorio Clínico Omega, de la ciudad de Ambato durante los meses de Enero 2016- Mayo 2016 bajo el tema: **"DETERMINACIÓN DE LA PROGESTERONA EN MUJERES EMBARAZADAS Y SU RELACIÓN CON EL ABORTO EN EL PRIMER TRIMESTRE DE GESTACIÓN QUE ACUDE A SER ATENDIDAS EN EL HOSPITAL DOCENTE AMBATO**

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad pudiendo la parte interesada hacer uso del mismo como bien creyere conveniente.

Atentamente


L.cdo. Marcelo Terán
LABORATORISTA CLINICO
MSP L. 5 F. 98 No. 296