



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

EFFECTOS DE UNA rhFSH (FSH RECOMBINANTE HUMANA), DERIVADA DE LÍNEAS CELULARES HUMANAS, SOBRE LOS PROTOCOLOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGO

PRESENTA:
RUBEN CORTES FLORES

DR. ANDRES ARAGON MARTINEZ
ASESOR

DRA. ITZEL ALEJANDRINA GALLARDO ORTIZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ REVISOR

Mtra. BEATRIZ MACEDO GARZON
VOCAL

DR. ANDRES ARAGON MARTINEZ
SECRETARIO

DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA
SUPLENTE

BIOL. ERICK JOSE LOPEZ ARREDONDO
SUPLENTE



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO
(FES IZTACALA) 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis padres, José e Isabel, de quienes tuve siempre y en todo momento su amor y apoyo incondicional bajo cualquier circunstancia y que me brindaron una educación y una formación profesional.

A mis hermanos José y Verónica quienes siempre me acompañaron en este camino dándome todo su apoyo y compañía, pero muy particularmente a mi hermano quien nunca dejo de creer en mí a pesar de los años transcurridos.

De manera muy especial a mi esposa Orly Viridiana quien ha sido en gran parte el motor tras la culminación de esta etapa de mi vida impulsándome a concretar metas y a buscar nuevos horizontes profesionales y quien ha logrado expresar lo mejor de mí como persona. Gracias amor por todo tu apoyo sin el cual, estoy convencido, no hubiera sido posible culminar esta meta.

A la FES Iztacala, mi segunda y muchas veces mi primer casa, y a todos mis profesores quienes compartieron conmigo su conocimiento y calidad académica, por haberme acogido en sus instalaciones durante todos mis años de formación profesional y que hoy forman una parte entrañable de mi vida.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por aceptar el reto de guiarme y apoyarme en el cierre de este ciclo bajo circunstancias únicas que marcarán nuestras vidas.

Dedico este trabajo a mis hijos, José, Fernando y Kenia y a mis sobrinas queridas, Sofía y Michelle, quienes son como mis hijas y quienes han sido mi motivo e inspiración de vida y en quienes deseo inculcar el amor por una formación profesional y el compromiso de vivirla como profesionales exitosos y responsables.

Gracias a todos.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCION	7
SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO	9
Anatomía y fisiología	9
Genitales Externos.....	9
Genitales Internos	11
OVARIO	19
Foliculogénesis y ovogénesis.....	20
Folículos primordiales	22
Folículos preantrales (antes Folículos primarios).....	23
Folículos antrales (antes Folículos secundarios)	24
Folículo preovulatorio (antes Folículo terciario o de Graaf).....	25
OVULACION. CICLOS MENSTRUAL, OVARICO Y ENDOMETRIAL	27
Ciclo ovárico.....	28
Fase folicular	29
Reclutamiento folicular	29
Selección folicular.....	30
Dominancia folicular temprana	30
Dominancia folicular tardía.....	31
Fase ovulatoria.....	32
Fase lútea	32
Ciclo endometrial.....	33
Fase proliferativa temprana	33
Fase proliferativa tardía.....	33
Fase secretora.....	33
REGULACION HORMONAL DEL SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO	35
Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).....	37
Gonadotropinas hipofisarias (FSH/LH)	39
Importancia de las isoformas de FSH	43

Regulación endocrina del ciclo menstrual.....	46
Fase folicular temprana. Día 1 del ciclo menstrual.	48
Fase folicular tardía. Día 6 del ciclo menstrual.	48
Fase ovulatoria. Día 14 del ciclo menstrual.....	49
Fase lútea. Aproximadamente del día 15 al 26 del ciclo menstrual.	50
Fase menstrual o de transición lúteo-folicular. Últimos días del ciclo.	50
INFERTILIDAD.....	52
Definiciones de infertilidad y datos nacionales.....	52
Técnicas en reproducción asistida	55
Técnicas de baja complejidad	56
Coito programado	57
Inseminación intrauterina (IIU).....	57
Perfusión espermática tubaria (PET).....	59
Técnicas de moderada complejidad	60
Transferencia Intratubaria de gametos (GIFT)	61
Transferencia de precigotos en estado de pronúcleo (PROST)	61
Transferencia Intratubaria de cigotos (ZIFT)	62
Fertilización In Vitro y transferencia embrionaria (FIV&TE).....	62
Técnicas de alta complejidad	64
Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)	65
Inyección intracitoplásmica de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSSI) .	67
Hiperestimulación ovárica controlada (HOC).....	67
Agonistas de la GnRH	69
Antagonistas de la GnRH.....	70
Gonadotropinas hipofisarias (FSH/LH)	72
Gonadotropina coriónica humana / Coriogonadotropina (hCG)	73
Retos actuales en reproducción asistida	74
LA FSH Y SU MANEJO EXOGENO	77
Diferencias biológicas entre FSH urinaria y recombinante.....	80
Generalidades del ADN recombinante	84
Tecnología en la obtención del ADN recombinante	85
Aislamiento del ADN.....	85
Recombinación del ADN.....	87
Transformación por transfección	88

Clonación/Amplificación	90
Producción hormonal. Síntesis de una FSH recombinante.....	91
Creación de una FSH recombinante de origen humano.....	97
Dosificación de una FSH recombinante de origen humano	101
Efectos de una FSH recombinante de origen humano	108
Experiencia comparada del uso de una FSH recombinante en sus diferentes tipos.....	110
<i>ANALISIS COSTO-BENEFICIO DE UNA FSH RECOMBIANTE</i>	114
<i>COMENTARIOS Y CONCLUSIONES</i>	117
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	119

RESUMEN

Durante los últimos 20 años los problemas de infertilidad se han visto exacerbados en la población mundial lo que ha conllevado a la generación de conflictos de orden social, familiar o de pareja que impactan en el libre derecho a procrear de los individuos. En consecuencia, existe una demanda cada vez más creciente de atención profesional para la resolución de este problema y el logro de un embarazo viable con un producto vivo.

En este contexto, el campo de la biología reproductiva ha jugado un papel crucial al aportar una profunda y detallada comprensión del proceso reproductivo en la especie humana y cuya unión a los constantes avances tecnológicos le permite ofrecer alternativas de solución reales a estas parejas. Esta sinergia ha dado lugar a diferentes métodos y técnicas que facilitan o sustituyen los procesos naturales de fertilización y que en conjunto se conocen como reproducción asistida.

El presente trabajo tiene por objetivo hacer una revisión bibliográfica, acompañada por la experiencia laboral del autor en este campo a nivel nacional e internacional, sobre los diferentes aspectos que actualmente rigen al campo de la reproducción asistida en México, la amplia versatilidad de su aplicación y los avances tecnológicos que han acompañado su creciente expansión a nivel mundial y dentro de los cuales destaca la producción de preparaciones hormonales de FSH que por primera vez tienen un origen 100% humano imitando en forma precisa la respuesta ovárica natural haciéndola más predecible y facilitando su manipulación exógena.

Es también una invitación a la incorporación del Biólogo a áreas científicas en donde su participación no solo es necesaria sino determinante por el entendimiento que esta disciplina tiene de la vida y su funcionamiento.

INTRODUCCION

La infertilidad es un problema de salud mundial que afecta entre el 8 y 10% de las parejas en edad reproductiva. La prevalencia de la infertilidad varía mucho de una región a otra e incluso entre países de una misma región debido a una conocida condición de subregistro que no permite tener una visión global del problema.

En México, existe una seria inconsistencia en estudios epidemiológicos que permitan tasar adecuadamente la prevalencia de la infertilidad en la población, pero diferentes trabajos de investigación asumen que afecta a un 10% de las parejas (Vite Vargas et al., 2005).

Dentro de estas, se estima que un 60% presentan factor femenino, un 30% factor masculino y un 10% presentan desordenes en ambos cónyuges. Las causas de infertilidad son muy diversas entre la población mexicana, pero entre todas ellas el factor endocrino-ovárico es muy frecuente con hasta un 35% de los casos dentro de los cuales un 42% se deben a síndrome de ovario poliquístico. El factor tubo-peritoneal representa un 28% de los casos, mientras que el factor masculino ostenta un 26% (González & Serrano, 2010).

Desgraciadamente, en México la salud reproductiva goza de la indiferencia gubernamental por considerar que es una condición suntuosa que no pone en peligro la vida de quien la padece y por ello no existen planes de tratamiento o estrategias de abordaje para el manejo de la pareja infértil en el país. Debido a lo anterior tampoco existe una partida presupuestal dentro del sistema de salud mexicano destinada al tratamiento de estas parejas. En México solo existen cuatro hospitales de carácter público que tienen la capacidad de ofrecer servicios gratuitos de salud reproductiva, pero que desafortunadamente no cuentan con los recursos necesarios para atender a una población cada vez más creciente que demanda su atención.

Esto ha permitido que el campo de la salud reproductiva a nivel mundial tenga un notable crecimiento exponencial asociado a múltiples avances tecnológicos no solo de carácter técnico sino también médicos, bioquímicos, genéticos e inmunológicos.

Esto ha dado lugar al surgimiento de las técnicas en reproducción asistida. Actualmente, se calcula que cada año se realizan más de un millón de procedimientos de reproducción asistida a nivel mundial.

Las técnicas en reproducción asistida basan su productividad en la manipulación exógena del eje hipotálamo-hipófisis-gónada para lo cual es necesario el manejo de diferentes preparaciones hormonales de las cuales la más determinante con absoluta certeza es la FSH por sus implicaciones en la ovogénesis. Desde la década de los 50's comenzaron a desarrollarse diferentes metodologías de purificación hormonal con el fin de obtener preparaciones funcionales de FSH a partir de diversas fuentes (Smitz et al., 2016).

La conclusión del proyecto Genoma y el perfeccionamiento de técnicas de aislamiento y purificación basadas en inmunología e ingeniería genética permitieron identificar y secuenciar al gen que codifica la síntesis de la FSH y esto marco el inicio de una carrera tecnológica por la obtención de preparaciones hormonales cada vez más similares a la FSH producida naturalmente en el ser humano.

Actualmente, existe cierta variedad de preparaciones de FSH disponibles en el mercado, pero que hasta el 2017 no guardaban estricta similitud a la FSH natural debido sobre todo a los diferentes patrones secundarios de maduración proteica obtenidos en las líneas celulares de cultivo no humanas utilizadas para su producción.

Recientemente, han sido establecidas líneas de cultivo celulares de origen humano que sirven como bancos de producción de la primera preparación de FSH con un origen 100% humano y que ya está disponible a nivel mundial.

SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO

En su conjunto el sistema reproductor femenino se compone por los ovarios y el resto de los órganos sexuales, pero sus orígenes siguen caminos muy distintos y, aunque el sexo del embrión se define por mecanismos genéticos en el momento de la fertilización, las gónadas no exhiben características masculinas o femeninas antes de la séptima semana de gestación.

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

En la anatomía del aparato genital femenino es necesario distinguir entre aquellas estructuras que tienen una localización externa de aquellas que se ubican internamente.

Genitales Externos

Los genitales externos cumplen con una función copuladora y de protección y están representados por una serie de estructuras que pueden ser agrupadas bajo el término colectivo de vulva. El monte de Venus es la estructura más inmediatamente visible y se constituye por un cojinetete de grasa cubierta de piel y vello adoptando en la mujer una clásica figura de triángulo con la base invertida.

En la parte inferior al monte de Venus, en dirección antero-posterior, se abren dos pliegues de piel, constituidos también por grasa, que se denominan labios mayores. Su posición y trayecto son simétricos. Se fusionan al inicio y al final de su recorrido de tal manera que entre ellos se abre un espacio llamado hendidura vulvar que alberga otras estructuras. Los labios mayores contienen glándulas sebáceas y sudoríparas en su interior mientras que su superficie externa también está recubierta por vello. Embriológicamente los labios mayores son un órgano paralelo al escroto masculino (Jacob et al., 1990).

Por dentro de la hendidura vulvar se extiende otro par de pliegues cutáneos considerablemente más delgados que los mayores que se denominan en consecuencia labios menores.

El espacio existente entre los labios menores se denomina vestíbulo vulvar y en él se encuentra el orificio vaginal y el meato uretral que son en realidad la desembocadura de los genitales internos y del sistema urinario respectivamente.

Los labios menores se encuentran plegados sobre sí mismos brindando por ello protección a el *clítoris* que embriológicamente equivale a un pene rudimentario y que al igual que el órgano masculino se encuentra formado por dos pequeños cuerpos cavernosos y un glande, ambos provistos de capacidad eréctil y sensorial, inervados y vascularizados (Jacob et al., 1990) (FIGURA 1).

En el vestíbulo vulvar se encuentra también la desembocadura de las llamadas glándulas de Bartolini cuya función radica en secretar moco que se conjuga con el moco cervical para brindar lubricación durante la excitación sexual (Berne et al., 2008; Jacob et al., 1990).

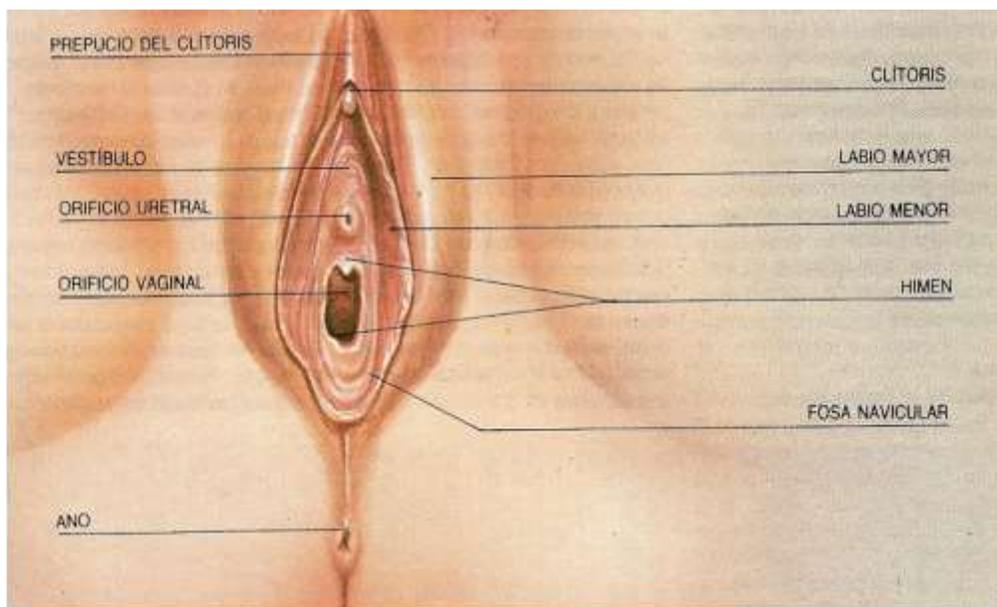


FIGURA 1: Genitales femeninos externos
Adaptado de Anatomía y fisiología humana 4ª ed. (p. 211) por Jacob, N. 1988, Interamericana

Genitales Internos

Los genitales internos inician su configuración anatómica con la *vagina* la cual es un órgano en forma de saco ciego que antecede al útero o matriz y cuya función radica en recibir al pene durante el coito o cópula y servir como vía de salida al feto durante el parto gracias a la gran distensibilidad que presenta. La vagina se constituye por paredes de tejido conectivo que a su vez contienen fibras musculares lisas revestidas por tejido epitelial. Estas paredes suelen estar en contacto entre sí formando por tanto un saco cerrado. La pared anterior de la vagina está en contigüidad anatómica a la vejiga y su uretra mientras que la posterior lo está con el recto. Ambas paredes difieren en sus longitudes siendo la posterior más larga en tres o cuatro cm. que la anterior debido al punto de inserción anatómica del útero que sigue un plano oblicuo hacia arriba y hacia adelante. Debido a este tipo de inserción una parte del útero protruye en la vagina dando lugar al llamado *cérvix* o cuello uterino (Berne et al., 2008).

La protrusión del *cérvix* en la vagina da origen a dos bóvedas, una anterior y otra posterior. Esta última tiene alta relevancia en el proceso de la fertilización pues en ella se recoge el eyaculado, pero también en el diagnóstico citológico de diversas enfermedades. La vagina esta desprovista de glándulas y su lubricación está en dependencia del moco producido por el *cérvix* (Fox, 2008; Jacob et al., 1990) (FIGURA 2).

El *cérvix* representa solo 1/3 del cuerpo total del útero, pero a diferencia de este, tiene alta importancia en el proceso reproductivo por sus condiciones anatómicas y por su capacidad de secreción de moco ya que la interacción de estas secreciones con los espermatozoides es fundamental para su supervivencia y funcionamiento. El *cérvix* uterino está compuesto por tejido fibroso. En su inicio esta comunicado con la vagina por el llamado orificio cervical externo en el cual se encuentra la unión escamo-columnar y después de la cual inicia el conducto endocervical. Este último termina y desemboca en la cavidad uterina a través del orificio cervical interno (Berne et al., 2008; Fox, 2008; Sims & Gibbons, 1996) (FIGURA 3).

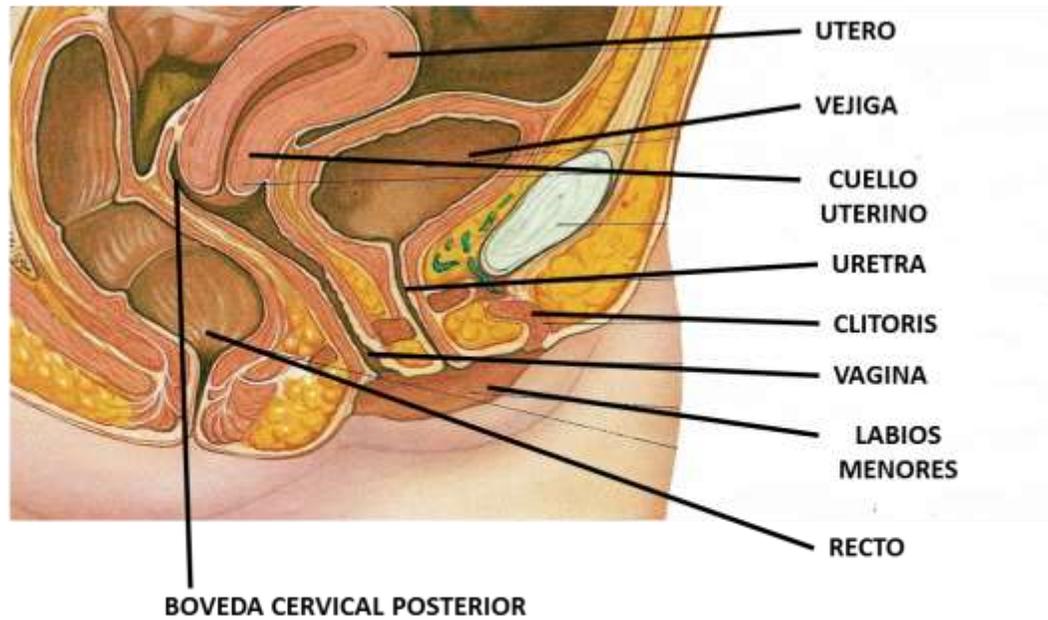


FIGURA 2: Genitales femeninos internos
Adaptado de Anatomía y fisiología humana 4ª ed. (p. 213) por Jacob, N. 1988, Interamericana

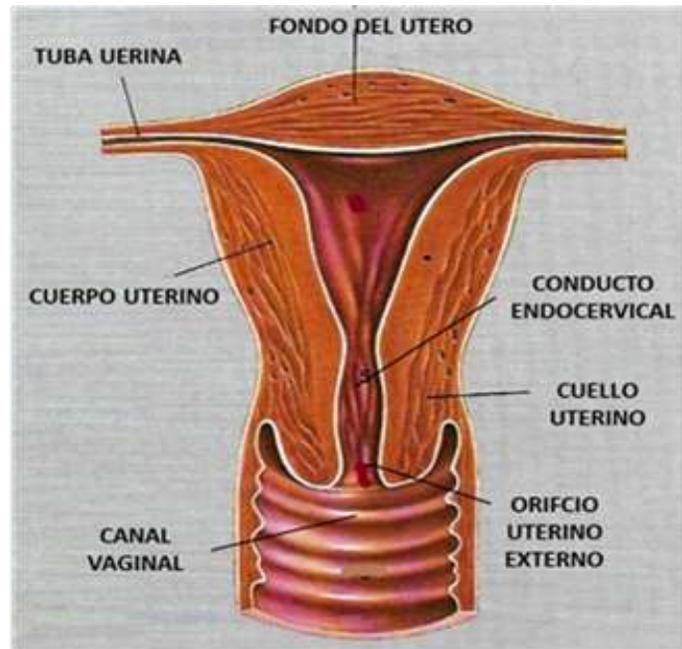


FIGURA 3: Relaciones anatómicas del cérvix uterino
Adaptado de Anatomía y fisiología humana 4ª ed. (p. 218) por Jacob, N. 1988, Interamericana

El conducto endocervical está constituido por una capa mucosa con múltiples pliegues distribuidos en un patrón similar a un árbol que le confiere el nombre de *Arbor vitae*. El 95% de las células son de naturaleza secretora y el restante 5% son ciliadas. El batido de estos cilios genera un movimiento de corriente hacia el exocervix. El epitelio es cilíndrico y genera numerosas invaginaciones o criptas (Moore & Persaud, 2003; Sims & Gibbons, 1996) (FIGURA 4).

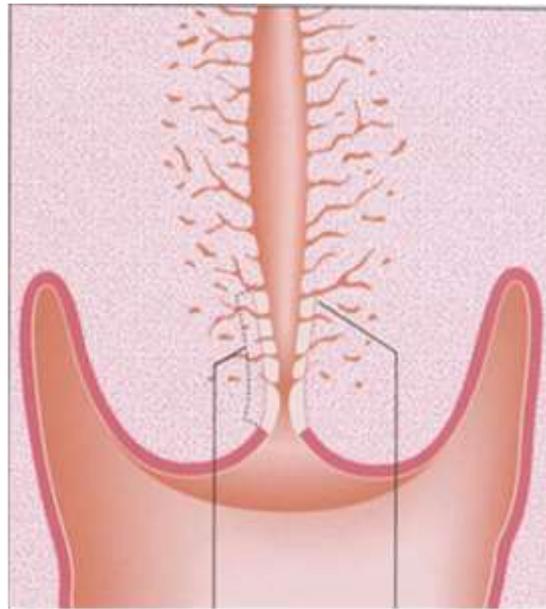


FIGURA 4: Conducto endocervical y *Arbor vitae*
Adaptado de *The developing human* (p. 162) por
Moore, Kl. 2003, Ph Saunders

El diámetro del orificio cervical externo, la actividad ciliar y el número de criptas se incrementan por acción de los estrógenos mientras que los progestágenos ejercen el efecto contrario. La cantidad y la calidad del moco producido varía en función de la influencia hormonal en las diferentes etapas del ciclo ovulatorio. El moco cervical es en realidad un hidrogel cuyas características fisicoquímicas cambian en las diferentes etapas de la ovulación formando macromoléculas, micelas o estructuras filamentosas.

Con todo ello, y conjuntamente con la acción ciliar de la mucosa, el cérvix no es un elemento pasivo en el transporte de los espermatozoides, por el contrario, es muy activo (Eriksen et al., 1998).

Por arriba del cérvix se localiza el útero o matriz. El útero es un órgano sólido hueco, con una cavidad virtual en forma de pera invertida. Se localiza entre el sigmo intestinal y la vejiga. Sus dimensiones son menores en mujeres nulíparas o con bajos niveles hormonales, como sucede en la menopausia, y son mayores en mujeres con embarazos recientes o múltiples. Sus paredes se componen por tejido de sostén seroso, llamado perimetrio sobre el cual descansan fibras musculares lisas longitudinales, circulares y oblicuas con abundante vascularización y que se conocen en conjunto como miometrio. La capa más interna de la estructura uterina se compone de tejido mucoso y se le denomina Endometrio (Jacob et al., 1990; Moore & Persaud, 2003; Sims & Gibbons, 1996) (FIGURA 5).

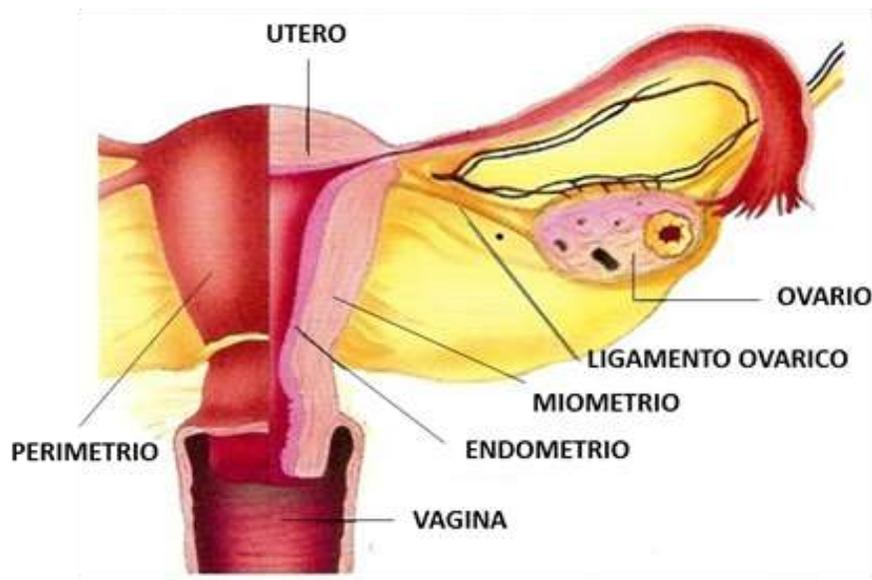


FIGURA 5: Anatomía uterina.
Adaptado de The developing human (p. 201)
por Moore, Kl. 2003, Ph Saunders

El endometrio está formado por un estroma, glándulas, tejido conectivo y una fina irrigación dada por las arterias basales y espirales que son en realidad terminaciones de las arterias uterinas. Se divide en dos capas: una capa basal profunda que se regenera cíclicamente ocupando un tercio del espesor total y una capa funcional superficial que se descama mensualmente y ocupa los 2/3 restantes (Sims & Gibbons, 1996).

Todas las estructuras anatómicas del útero se conjugan para permitirle tres funciones destacables:

❖ *COADYUVAR EN EL TRANSPORTE DE LOS ESPERMATOZOIDES*

Una vez que los espermatozoides son depositados vaginalmente inician la migración hacia las trompas de Falopio o tubas uterinas siguiendo un complicado fenómeno fisicoquímico basado en gradientes de concentración endocrina y para lo cual deben pasar invariablemente por el cérvix y el conducto endocervical. Algunos espermatozoides pueden almacenarse en las criptas cervicales, pero la mayoría se transporta de inmediato. Diversos trabajos sobre la movilidad espermática aceptan la imposibilidad de que tal migración sea debida solo a la acción flagelar de estas células y se invoca una acción facilitadora por contracciones uterinas estimuladas por prostaglandinas contenidas en el líquido seminal del semen.

❖ *PROPORCIONAR UN ENDOMETRIO ADECUADO PARA LA IMPLANTACION*

El ovulo fertilizado se traslada hacia la cavidad uterina a través de los oviductos en aproximadamente tres días. En el 4º día se ha desarrollado al estadio de mórula y para el 5º o 6º día se transforma en blastocisto y está listo para implantarse en el endometrio. Para cumplir esta finalidad el endometrio sufre una extensa serie de cambios en preparación para recibir al embrión. Estos cambios se conocen como decidualización. Sin embargo, tales cambios no los ejecuta el útero por sí mismo sino en respuesta a estímulos hormonales muy sincronizados.

❖ CAMBIOS ADAPTATIVOS PARA UN PRODUCTO EN CRECIMIENTO

Después de la implantación del embrión el útero realiza una serie de cambios que incluyen la hipertrofia y la expansión de las fibras musculares y que al final de la gestación llevaran su capacidad volumétrica a cinco litros y a un peso de casi 1000 gr. (Eriksen et al., 1998; Glass, 1995; Sadler & Langman, 2016).

En el fondo uterino, en ambas porciones laterales y superiores, están insertos dos conductos denominados clásicamente como trompas de Falopio o más recientemente como tubas uterinas u oviductos. Miden aproximadamente 10 o 12 cms. y su función consiste en dar dirección al ovulo previamente liberado por los ovarios y conducirlo hasta la cavidad uterina. Se componen de tejido seroso, muscular y mucoso dispuestos en capas y, contrario a lo que por mucho tiempo se asumía, conectan al útero con la cavidad peritoneal y no con los ovarios. El acercamiento con los ovarios solo se registra en las etapas ovulatorias gracias al *ligamento ovárico* (Glass, 1995; Hillier, 2009) (FIGURA 6).

Las tubas uterinas se dividen anatómicamente en cuatro porciones y en cada una de ellas pueden observarse cambios en la distribución de las capas de tejido que las componen. Estas capas son: intersticio o zona mural, istmo, ámpula y el infundíbulo o fimbria (Croxatto et al., 1977; Leung & Adashi, 2018) (FIGURA 6 Y 7).

La fimbria es la porción más distal del oviducto con respecto al útero y consta de una abertura abdominal llamada *ostium* y una serie de proyecciones digitiformes llamadas franjas tubarias. La capa muscular presente es muy delgada mientras que la capa mucosa, también llamada endosalpinx o endosalpinxe, es una continuación del endometrio uterino.

El endosalpinx está constituido por cuatro principales tipos celulares: ciliadas, secretoras, intercalares e indiferenciadas. Las células ciliadas poseen numerosos cilios por célula y poseen un citoplasma con un retículo endoplásmico granular fino con numerosas vesículas citoplásmicas (Fox, 2008).

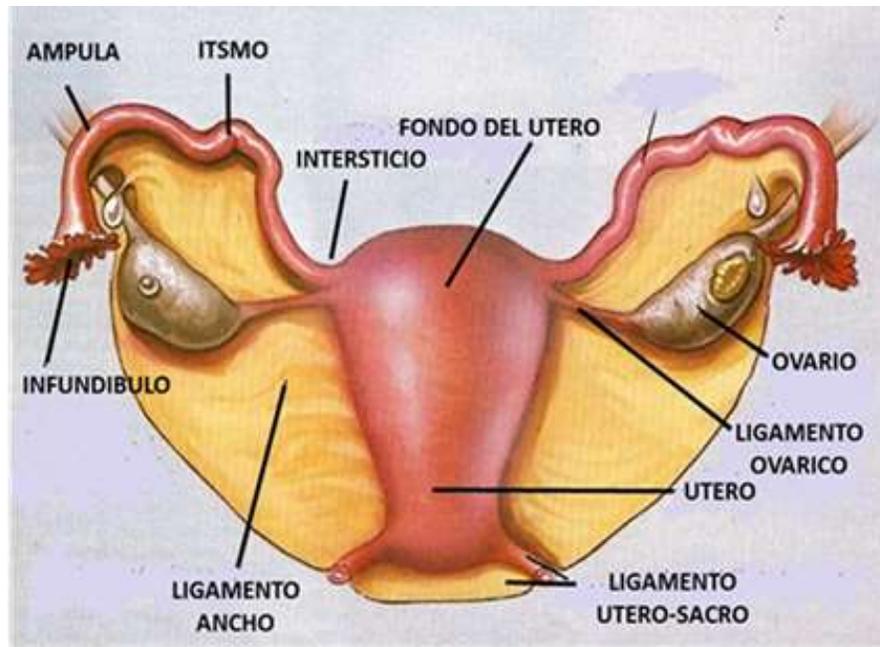


FIGURA 6: Porciones de las tubas uterinas y relaciones anatómicas
 Adaptado de Anatomía y fisiología humana 4ª ed. (p. 225) por
 Jacob, N. 1988, Interamericana

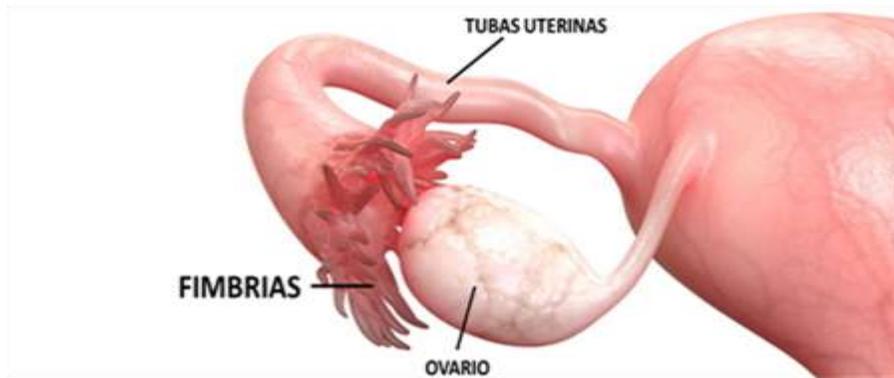


FIGURA 7: Fimbrias uterinas
 Adaptado de Fisiología humana 10ª ed. (p. 174) por Fox, Sl. 2008, Mc Graw Hill
 Interamericana

Con la acción de los estrógenos estas células incrementan su número y su actividad ciliar alcanzando sus niveles máximos durante la ovulación. La actividad ciliar está altamente sincronizada creando con ello una corriente de la cavidad abdominal hacia el ostium. Las células secretoras, por su parte, exhiben microvellosidades en su región apical y en su citoplasma es posible apreciar un prominente aparato de Golgi, así como grandes mitocondrias y gránulos secretores que tienden a acumularse durante la fase folicular liberándose en el lumen después de la ovulación (Glass, 1995; Sadler & Langman, 2016).

Debido al objetivo central de este trabajo, los ovarios serán revisados de forma independiente al resto de los genitales internos.

OVARIO

Embriológicamente los ovarios tienen el mismo origen que los testículos o gónadas masculinas. Representan las glándulas sexuales femeninas por excelencia con una actividad mixta secretando de forma endocrina diversas hormonas (estrógenos y progesterona entre otras) y de forma exocrina los gametos femeninos u óvulos. Son estructuras pares y ovoides de 3.5 por 1.5 cms. con una superficie irregular y un color blanco perlado situados en la parte inferior de la cavidad abdominal y mantenidos en su posición por diferentes ligamentos peritoneales. En cada ovario se pueden distinguir tres capas: la externa o corteza, la medula central y el hilio o rete ovarii (Adashi, 1996; Austin, 1995).

La porción más externa de la corteza se conoce como túnica albugínea. La túnica albugínea está compuesta por un epitelio de células cubicas que cumple con funciones de protección mientras que, en la parte interna de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica, se albergan los folículos ováricos, las unidades precursoras de los óvulos femeninos (Hillier, 2009).

En la *médula* se concentran los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas que irrigan e inervan respectivamente al órgano y cuya entrada pasa a través del hilio.

En el ovario suceden dos fenómenos simultáneos pero independientes altamente determinantes en la fertilidad femenina conocidos como foliculogénesis y ovogénesis. Mientras la foliculogénesis trata del proceso de crecimiento y desarrollo de la estructura folicular, la ovogénesis es el proceso de maduración del gameto femenino desde una célula primordial hasta un óvulo maduro con capacidad fecundativa, proceso que implica la reactivación de la división meiótica detenida (Peña, 2019).

En la foliculogénesis una hormona, la hormona Antimülleriana (*AMH, AntiMüllerian Hormone*), tendrá un papel clave en el desarrollo y maduración folicular. La AMH ya antes había sido determinante en la diferenciación sexual de la etapa embrionaria (Sadler & Langman, 2016).

FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS

Durante la segunda semana de gestación, un grupo de células derivadas del epiblasto embrionario, dan lugar a las llamadas células germinales primordiales (CGP), las cuales cruzan la línea primitiva durante la gastrulación y se establecen en la pared del saco vitelino. Hacia la cuarta semana de gestación, las CGP expanden considerablemente su número por medio de divisiones mitóticas e inician su migración a las crestas gonadales llegando a ellas hacia el final de la quinta semana. En esta etapa tiene lugar la diferenciación de las CGP en ovogonias que mantienen las divisiones mitóticas hasta el cuarto y quinto mes de gestación de tal forma que al séptimo mes se calcula la existencia de hasta 7 millones de ovogonias en el ovario (Abramovich et al., 2014; Hillier, 2009; Leung & Adashi, 2018; Sadler & Langman, 2016).

A partir de este momento las ovogonias están sujetas a 3 procesos simultáneos de mitosis, meiosis y atresia en los que intervienen los genes TIAR y TIAR 1 (*T cell intracellular antigen 1 related*), que también intervienen en el proceso de apoptosis, y el gen Pog (*Proliferation of germ cells*). La expresión de la función biológica de estos genes es balanceada, pero hacia los últimos meses de gestación predomina la expresión de la función apoptótica. En consecuencia, el número de ovogonias empieza a decrecer por atresia y en aquellas ovogonias remanentes se da la diferenciación a un ovocito primario rodeado por células epiteliales planas provenientes del epitelio celómico (folículos primordiales) (Peña, 2019; Sadler & Langman, 2016).

Los ovocitos primarios inician ahora su división meiótica la cual se detendrá en la etapa de diploteno de la profase I y se mantendrá en este estado de reposo hasta poco antes de la pubertad. Sobre los folículos primordiales sucederán diversos procesos biológicos que darán continuidad a su maduración (Adashi, 1996; Austin, 1995).

Los folículos son estructuras circulares formadas por células que envuelven al ovocito y se encuentran en el tejido conectivo laxo de la corteza ovárica. Ambos, folículo y ovocito, mantienen una estrecha unión durante sus respectivos procesos de crecimiento y maduración a lo largo de los cuales surgen otros tipos celulares asociados (Sadler & Langman, 2016).

Las células más internas se denominan células de la granulosa y cumplen con varias funciones entre las cuales destaca la secreción de AMH. Son muy similares a las células de Sertoli del testículo masculino y se encuentran cubiertas por una capa homogénea y densa llamada membrana basal que las aparta de las células externas o tecaes, las cuales a su vez separan todo el folículo del estroma ovárico (Adashi, 1996; Leung & Adashi, 2018).

De forma general se acepta que al momento del nacimiento una mujer ya solo cuenta con aproximadamente un millón de folículos primordiales. Este *pool* de folículos congénitos se denomina Reserva Ovárica, es un biomarcador biológico totalmente personal y esto le permite ser una métrica de amplia utilidad en el tratamiento de la infertilidad, ya que permite conocer el potencial reproductivo de cada mujer en un tiempo dado (Austin, 1995; Grudzinskas et al., 1995).

Durante las primeras cuatro décadas de vida la reserva ovárica sufre continuos cambios cuantitativos que conducen a un decremento progresivo en su número de tal forma que en la pubertad solo restan 500,000 folículos primordiales y de estos solo 500 serán ovulados y tendrán la posibilidad de ser fertilizados (Abramovich et al., 2014; Benítez, 2003; Leung & Adashi, 2018).

El ritmo de decrecimiento de la reserva ovárica es completamente individual, de tal modo que cada mujer tendrá un remanente distinto de folículos primordiales en cada mes y cada año de su vida reproductiva. Por lo tanto, y dada la función secretora de AMH por las células de la granulosa del folículo, la cantidad de folículos remanentes en una mujer en un momento dado está directamente relacionada con la cantidad de AMH detectable en sangre (Adashi, 1996).

Clásicamente los folículos se clasifican como primordial, primario, secundario y terciario o de Graaf, pero en la actualidad se aceptan más los términos primordial, preantral, antral y preovulatorio para distinguir su estado morfológico (Peña, 2019) (FIGURA 8).

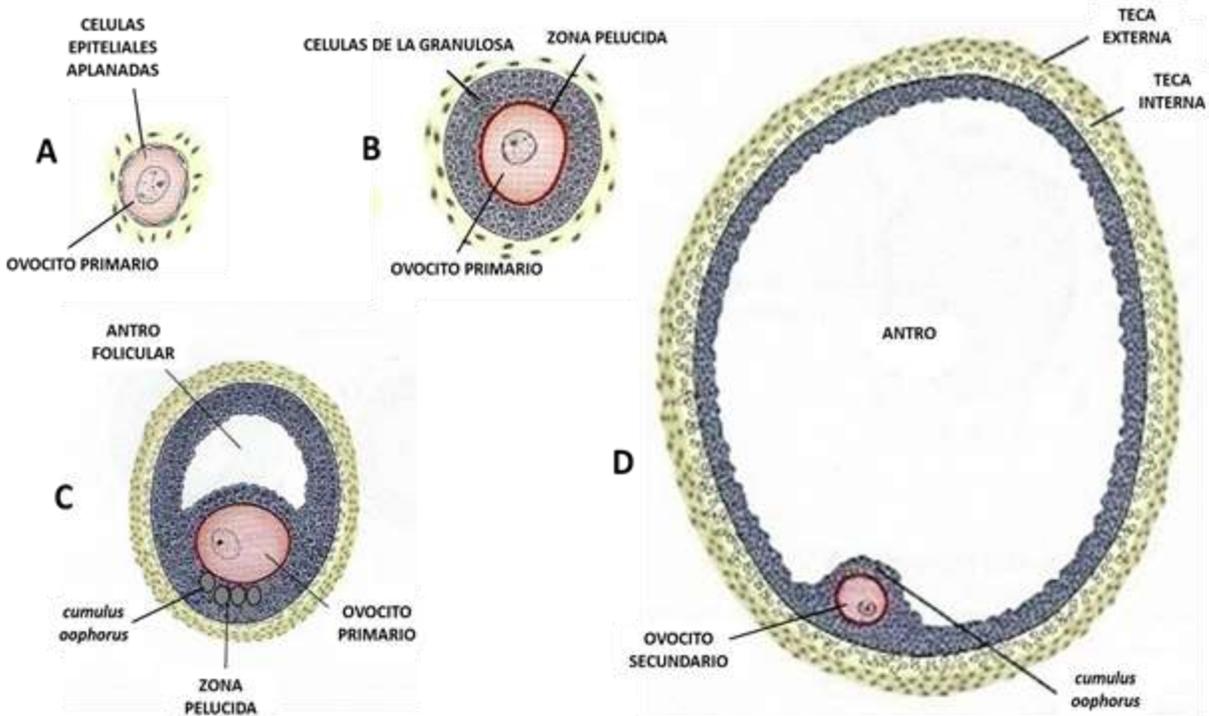


FIGURA 8: Desarrollo folicular. A. Folículo primordial. B. Folículo Preantral. C. Folículo Antral. D. Folículo Preovulatorio de Graaf
 Adaptado de Embriología médica 13ª ed. (p. 28) por Sadler, T.W. 2016, Wolters Kluwer

Folículos primordiales

Los folículos primordiales constituyen el mayor tipo de folículos presentes en la corteza ovárica y son el tipo celular que representan la reserva ovárica de cada mujer. Su diámetro es de aproximadamente 45 μm mientras que el del ovocito primario que contienen es de 20 μm . Solo una capa de células de la granulosa rodea al ovocito con una membrana basal que lo separa del estroma circundante (Adashi, 1996; Austin, 1995).

La meiosis I que dio inicio en la ovogonia después de su migración, se encuentra suspendida en el diploteno de la profase I y solo se reactiva años después hasta el inicio de la pubertad en la mujer misma etapa en la que los folículos primordiales reinician su proceso de maduración llevándoles solo unos meses pasar al siguiente estadio.

Los mecanismos determinantes que dan inicio al crecimiento folicular son independientes del estímulo gonadotrópico endógeno y por lo tanto se originan en el mismo ovocito debido a factores genéticos (Adashi, 1996; Leung & Adashi, 2018).

En este punto la hormona Folículo Estimulante (*FSH*) no es necesaria. Esto ha quedado demostrado gracias a varios trabajos de hipofisectomización en animales donde a pesar de la intervención presentan desarrollo folicular inicial. Incluso humanos con mutaciones en la subunidad β de la FSH o con daños en el gen receptor de FSH también presentan desarrollo folicular (Adashi, 1996; Hsueh et al., 2015; Tilly & Telfer, 2009; Zhu & Fu, 2019).

Folículos preantrales (antes Folículos primarios)

Cuando los folículos primordiales comienzan a crecer las células de la granulosa circundantes pasan de ser planas a cuboides formando un epitelio estratificado y cambiando su denominación a folículos preantrales.

Los folículos preantrales contienen un ovocito primario de aproximadamente 80 μm rodeado ahora por una cubierta glucoproteica denominada zona pelúcida que a su vez está recubierta por varias capas de estas células de la granulosa cuboidales. Cada folículo puede oscilar entre 150 y 200 μm . (Adashi, 1996; Austin, 1995).

El número de capas de células de la granulosa empieza a incrementarse y conforme lo hacen se crean pequeños espacios extracelulares que terminan por confluir en una sola cavidad llamada Antro o cavidad antral y que favorecen la secreción de glucosaminoglicanos (líquido folicular). También inicia la secreción de AMH.

En esta etapa existen aproximadamente 5000 células de la granulosa sobre las cuales inicia la expresión de receptores específicos para FSH, estrógenos y andrógenos y comienzan a darse uniones entre sus membranas plasmáticas o *gap junctions*. Estas uniones permiten que se realicen intercambios celulares y se coordine la respuesta a la estimulación hormonal (Peña, 2019).

La FSH adquiere alta importancia por ser la hormona más importante en la inducción al crecimiento y desarrollo foliculares. El folículo inicia su emigración de la corteza ovárica a la medula ovárica y comienza a formarse la teca interna que consiste en células alargadas de secreción esteroide además de tejido conectivo y la inclusión de capilares sanguíneos con lo cual, y por primera vez, el ovocito es expuesto al medio hormonal endógeno (Austin, 1995; Peña, 2019).

En la membrana de las células de la teca interna se expresan receptores para hormona Luteinizante (LH) lo cual marca la completa diferenciación del folículo preantral y lo prepara para una serie de cambios estructurales y bioquímicos inducidos por las gonadotropinas (FSH/LH) que guiarán su desarrollo hacia un folículo antral.

Folículos antrales (antes Folículos secundarios)

Un folículo antral tiene un diámetro aproximado de 250 a 300 μm . Por la acción de la FSH y la acumulación del líquido folicular el diámetro del folículo aumenta, y en la cavidad antral se forman canales hídricos mediados por proteínas denominadas Acuaporinas (Austin, 1995). Al continuar el crecimiento folicular se comprime a las células del estroma circundante formando la teca externa, una capsula fibrosa. La secreción de AMH se mantiene también muy activa como uno de los principales productos resultantes de la expresión de las células de la granulosa.

El antro y su fluido facilitan la formación del complejo llamado *cumulus oophorus* o *discus proligerus*, el cual es una estructura formada por células de la granulosa que rodean al ovocito; después de la ovulación esta estructura se conoce como *corona radiata*. Su función radica en servir como vehículo en el intercambio de nutrientes, proteger al ovocito y coordinar su maduración.

En las células de la granulosa se expresan receptores para (LH), prolactina (PRL) y prostaglandinas (PG) y se establece un sistema de comunicación intracelular con las células adyacentes. Los receptores para LH se expresan en una relación directamente proporcional al número de células de la granulosa existentes alcanzando su máximo nivel en el estadio preovulatorio (Austin, 1995).

En esta etapa del desarrollo folicular se requieren bajos niveles de gonadotropinas circulantes por lo que se denomina fase de crecimiento tónico. Aun con ello la expresión de receptores a FSH sigue siendo primordial.

La siguiente fase de crecimiento es inducida por una descarga de LH, y se denomina fase de crecimiento exponencial o dependiente de gonadotropinas. En ella los receptores a FSH son imprescindibles y permiten la conversión en un folículo preovulatorio o folículo de Graaf, estadio al que solo llegan unos cuantos folículos mientras que el resto sufre atresia (Adashi, 1996; Peña, 2019).

Folículo preovulatorio (antes Folículo terciario o de Graaf)

En el folículo preovulatorio las células de la granulosa se agrandan y comienzan a tener inclusiones lipídicas mientras que las células de la teca se vascularizan. En esta etapa sus dimensiones pueden llegar a los 20 mm.

Es hasta este momento cuando el ovocito primario reactiva su división meiótica, inducido por el pico de LH, terminando así la meiosis I y dando lugar a dos células hijas haploides (23 cromosomas) de diferente tamaño y cuyos cromosomas aún están duplicados (Audesirk et al., 2003; Sadler & Langman, 2016).

Una de estas células es el ovocito secundario, que recibe la mayor parte del citoplasma durante la citocinesis mientras que la otra célula es el primer corpúsculo polar que prácticamente no recibe nada (Adashi, 1996; Peña, 2019) (FIGURA 9).

El ovocito secundario entra ahora en meiosis II. Sin embargo, la división vuelve a detenerse ahora en metafase II aproximadamente tres horas antes de la ovulación. La meiosis II solo se completará si el ovocito queda fertilizado generándose el segundo corpúsculo polar, de lo contrario, la célula degenera aproximadamente 24 horas después de la ovulación. El primer corpúsculo polar puede experimentar una segunda división (Simerly, 1995).

Durante todo el proceso de foliculogénesis los folículos han pasado de 50 μm . a 20 mm. de diámetro mientras que el ovocito ha pasado de 80 a 100 μm .

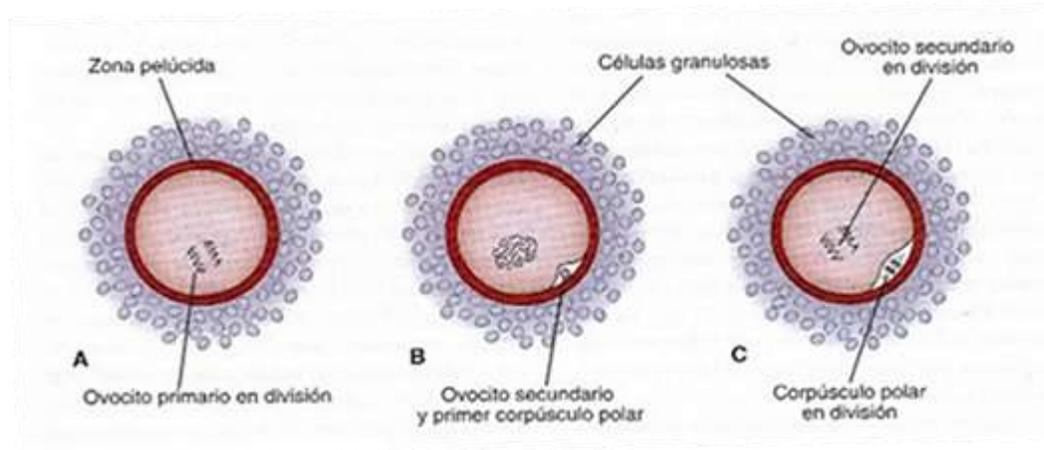


FIGURA 9: Maduración del ovocito. A: ovocito primario en primera división meiótica. B: ovocito secundario después de la reactivación de la meiosis y primer corpúsculo polar. C: ovocito secundario en segunda división meiótica

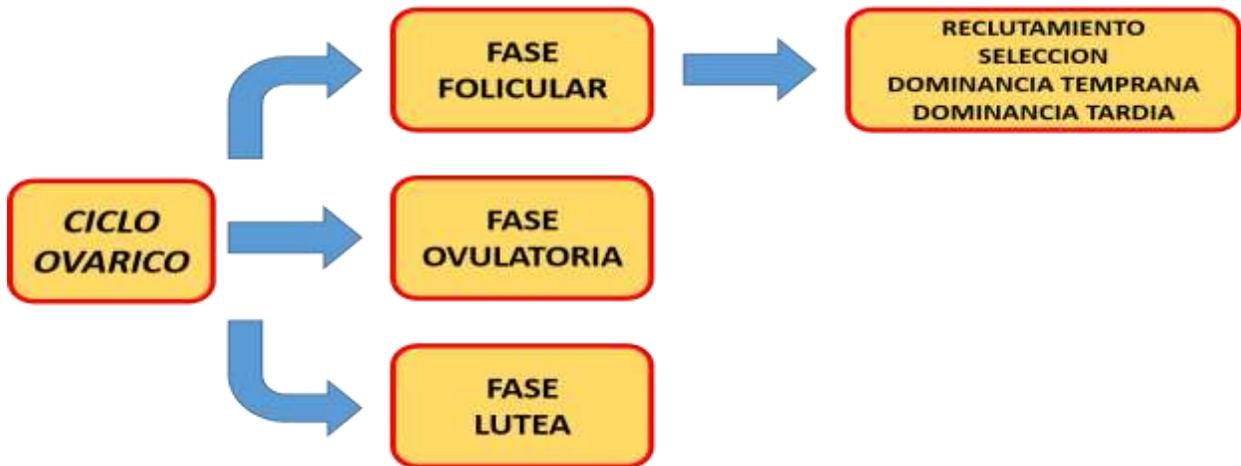
Adaptado de Embriología médica 13ª ed. (p. 28) por Sadler, T.W. 2016, Wolters Kluwer

OVULACION. CICLOS MENSTRUAL, OVARICO Y ENDOMETRIAL

Conjuntamente con la secreción de hormonas (esteroideas y proteicas), la ovulación es una de las funciones principales de los ovarios.

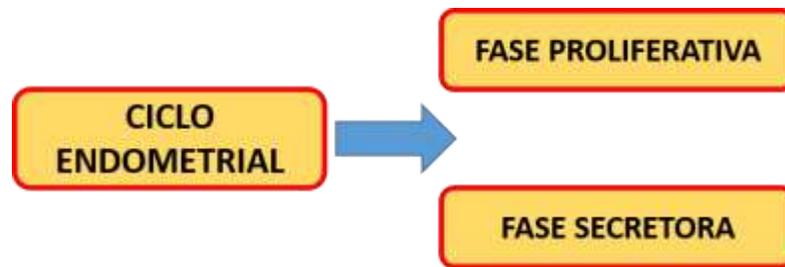
Los ovarios no son solo glándulas estáticas que responden a la estimulación de hormonas endógenas, sino que son capaces de modular la liberación de estas a través de sus subunidades funcionales como lo son los folículos, el estroma y el cuerpo lúteo (Adashi, 1996; Johnson et al., 2004; Leung & Adashi, 2018).

El fenómeno ovulatorio incluye diversos eventos intraováricos que tienen por objetivo la liberación de un óvulo dentro de las tubas uterinas con la posibilidad de ser fertilizado. Estos eventos forman un ciclo biológico denominado ciclo ovárico.



En el endometrio uterino se da también una serie de cambios progresivos que tienen por finalidad preparar a este tejido para la recepción del ovulo cuando este ha sido fertilizado. Estos cambios suceden de forma paralela al desarrollo del ciclo ovárico y son los responsables de estimular el crecimiento y maduración endometrial brindando así las condiciones necesarias para que pueda darse el fenómeno de la gestación.

En ausencia de gestación se induce la interrupción del desarrollo endometrial lo que se manifiesta con su autodestrucción y un posterior sangrado transvaginal, fenómeno conocido como menstruación, para dar inicio a un nuevo ciclo de desarrollo endometrial. A todos estos eventos se les conoce como ciclo endometrial (Johnson et al., 2004; Simerly, 1995; Tilly & Telfer, 2009).



El ciclo ovárico y el ciclo endometrial están superpuestos y en conjunto constituyen el ciclo menstrual (Simerly, 1995; Tilly & Telfer, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, la mayor parte de los folículos que se encuentran en la corteza ovárica interna corresponden a folículos primordiales los cuales una vez llegada la pubertad, y en tan solo algunos meses, se transforman en folículos preantrales.

CICLO OVÁRICO

El ciclo ovárico se compone por una serie de eventos progresivos que incluyen, además del desarrollo de un óvulo maduro, su liberación (ovulación) y un posterior aporte hormonal de soporte que será de amplia utilidad si el ovulo es fertilizado. Estos eventos se dividen en tres fases: folicular, ovulatoria y lútea (Peña, 2019).

Fase folicular

La fase folicular es la primer etapa del ciclo ovárico y en ella tiene lugar la elección biológica del folículo cuyo óvulo será liberado en el ciclo. Este proceso de elección es en realidad un proceso de desarrollo competitivo determinado por el grado de madurez alcanzado por los folículos que a su vez está relacionado con la capacidad de respuesta hormonal alcanzada.

El desarrollo folicular se alcanza en cuatro etapas denominadas como reclutamiento, selección y dominancia temprana y tardía (*FIGURA 10*).

Reclutamiento folicular

Alrededor de 70 días antes del inicio de un ciclo, un promedio de 20 folículos preantrales, entra en fase de reclutamiento de los cuales solo uno llegará a la etapa ovulatoria a través de un proceso de selección, dominancia y maduración. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual un grupo de folículos preantrales se activa para crecer y formar una *cohorte* de la cual un solo folículo será seleccionado, el llamado *folículo dominante*.

Se ha postulado que factores angiogénicos condicionan que algunos folículos primordiales sean mejor irrigados que otros y esto sea lo que conlleve a su elección para el reclutamiento (Peña, 2019). En esta etapa la FSH, que es innecesaria para el desarrollo y maduración folicular iniciales, se torna altamente determinante para el reclutamiento (Durlinger et al., 2002; Tilly & Telfer, 2009).

Las células de la granulosa de los folículos preantrales responden muy bien a la FSH lo que favorece el crecimiento folicular y algunos otros signos como la transformación celular de la granulosa de células aplanadas a cuboides o la estimulación de su actividad mitótica que las lleva a dividirse e incrementar el número de capas concéntricas que rodean al ovocito y que forman al folículo mismo.

La secreción de AMH también se intensifica y se encarga de inhibir al resto de los folículos primordiales para impedir un continuo reclutamiento (Durlinger et al., 2002).

Con estos cambios el folículo preantral se convierte en un folículo antral. Cronológicamente el reclutamiento ocurre durante la fase final de un ciclo previo, esto es, durante la llamada fase Lútea Tardía (Durlinger et al., 2002; Tilly & Telfer, 2009).

Selección folicular

Las células de la granulosa del folículo antral se diferencian en dos zonas: las que rodean la membrana basal del folículo y las que rodean al *cumulus oophorus* del ovocito. Con estos cambios también se dan cambios funcionales en el folículo que incluyen la capacidad de producir grandes cantidades de estradiol (*E2*) y progesterona (*P*). Se expresa también una mayor cantidad de receptores para LH en las células de la granulosa y con ello se adquiere la capacidad de liberación del ovulo ante el estímulo de la LH. La elevación intercíclica de la FSH determina que múltiples folículos antrales entren a estadios preovulatorios y la expresión de los receptores a FSH en membrana se incrementa con lo cual el folículo seleccionado como el dominante será aquel que tenga la mayor cantidad de receptores, con respecto a los demás folículos de su cohorte, y con ello alcanzar los umbrales hormonales necesarios para mantenerse a la cabeza en la carrera de crecimiento y escapar de la atresia (Durlinger et al., 2002). La selección folicular se da durante la primer semana de un nuevo ciclo momento que coincide con el inicio del ciclo endometrial (*FIGURA 10*).

Dominancia folicular temprana

Ya en estadio preovulatorio, y con una mayor expresión de receptores membranales a FSH, el folículo dominante alcanza un umbral hormonal y su crecimiento es exponencial sin importar que poco tiempo después la FSH disminuya y ocasione la atresia del resto de los folículos de la cohorte menos desarrollados y con menos receptores. El folículo dominante ahora es capaz de producir estrógenos y desencadena la liberación de la LH por retroalimentación positiva que por ahora ejerce sus efectos en las células tecales, y condiciona el rescate del folículo de la atresia contribuyendo a su crecimiento y maduración e induciendo finalmente la ovulación (Durlinger et al., 2002; Tilly & Telfer, 2009) (*FIGURA 10*).

Dominancia folicular tardía

Los receptores para LH de la granulosa sensibilizan al folículo a la acción de esta hormona y se desencadena la expresión de genes que responden al cAMP (*Adenosín Mono Fosfato cíclico*) y conducen a la rotura folicular y a la diferenciación final de la granulosa. La liberación de varios mediadores proinflamatorios y agentes angiogénicos inducen la supresión del crecimiento folicular, conducen a la rotura folicular y luteinizan al folículo iniciando la producción de P, E2 e inhibina A (IA). Esto origina el llamado *cuerpo lúteo* después de la rotura folicular y la liberación del ovulo. Los folículos menos maduros y que no generaron receptores para LH no pueden por ello ovular ni evolucionar a cuerpo lúteo, pero como el desarrollo folicular está completo la acción de la LH en ellos es deletérea (Tilly & Telfer, 2009) (FIGURA 10).

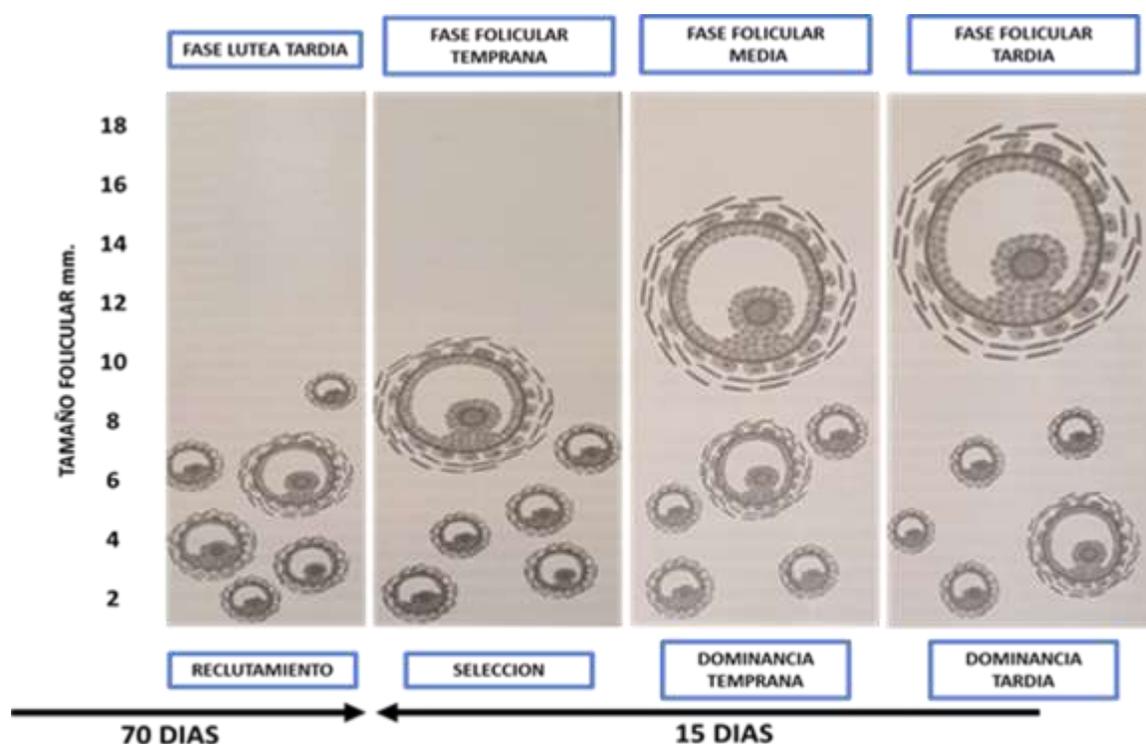


FIGURA 10: Fase Folicular del Ciclo Ovárico. El desarrollo folicular desde la etapa Preantral hasta la etapa Preovulatoria abarca un total de 85 días.
Adaptado de *Atención integral de la infertilidad 3ª ed.* (p. 301) por Pérez Peña, E. 2019, Panamericana

Fase ovulatoria

Esta fase reviste el evento más importante en la función reproductiva femenina e inicia entre 36 a 40 horas después de que inicia la elevación de la LH. El cambio inicial más importante es la expansión del *Cumulus oophorus*.

El mecanismo por el cual el folículo rompe en la superficie ovárica no se conoce por completo pero la secreción de estrógenos, específicamente el 17β Estradiol, parece ser clave pues es la señal que a su vez estimula la secreción de LH indispensable para la ovulación.

Antes de la ovulación el folículo preovulatorio se expande muy rápidamente sugiriendo un aumento de la presión del líquido intra folicular. La rotura se produce en un área de la superficie ovárica conocida como Estigma. Contrario a lo que se asumía, la ovulación no es un fenómeno explosivo sino una extrusión. Previamente se da una reducción de la presión intra folicular y después un adelgazamiento de la pared folicular con actividad proteolítica de varios agentes hormonales (Leung & Adashi, 2018; Peña, 2019).

Cuando la producción de estrógenos alcanza su pico máximo se da la elevación de la LH, transcurriendo entre ellas 14 horas aproximadamente. Una vez que se registra el pico de LH pasaran entre 12 y 16 horas más para que suceda la ovulación (Adashi, 1996; Durlinger et al., 2002; Leung & Adashi, 2018).

Fase lútea

Poco después de generada la ovulación el folículo roto y ahora vacío sufre diversos cambios que incluyen proliferación, regresión y vascularización que lo convierten en una estructura glandular sólida de uno a tres cm. de diámetro y de color amarillo que se denomina *cuerpo lúteo*.

Las células de la teca interna y de la granulosa sufren diversos cambios bioquímicos por acción de la LH denominados en conjunto *Luteinización*.

El cuerpo lúteo es ahora una estructura muy vascularizada que secreta esteroides, estrógenos y andrógenos, pero principalmente progesterona (Adashi, 1996). Su vida media es de aproximadamente 14 días mientras la mujer no se embarace. De no suceder esto inicia la Luteolisis, aún desconocida en sus mecanismos. Los restos de cuerpos lúteos en el ovario se transforman en tejido conectivo denso denominados ahora como *Corpus albicans*.

CICLO ENDOMETRIAL

Fase proliferativa temprana

En la primer semana de un nuevo ciclo, y después de la perdida endometrial del ciclo inmediato anterior, el tejido epitelial inicia una re-epitelización menstrual-posmenstrual estimulada por el estradiol. El espesor es menor a dos milímetros, pero se re-establece para el día 5 del nuevo ciclo por proliferación celular de las capas basales del endometrio (*FIGURA 11*).

Fase proliferativa tardía

En la segunda semana del nuevo ciclo se da una secreción epitelial muy abundante debido a la acción combinada del estradiol y la progesterona. El endometrio se engrosa por hiperplasia glandular. Cerca del momento de la ovulación el endometrio se torna más alto y comienza a estratificarse (*FIGURA 11*).

Fase secretora

El considerable aumento de la progesterona por el cuerpo lúteo y parte de los estrógenos provocan que la mucosa uterina entre en la fase progestacional o secretora e inducen importantes cambios característicos. La mucosa uterina aumenta su espesor y el tejido glandular se agranda y es característico el desarrollo de arterias espiraladas.

De no existir un embarazo el endometrio sufre regresión y necrosis culminando con la menstruación y la regresión del cuerpo lúteo (Glass, 1995; Loke & King, 1995; Sadler & Langman, 2016) (FIGURA 11).

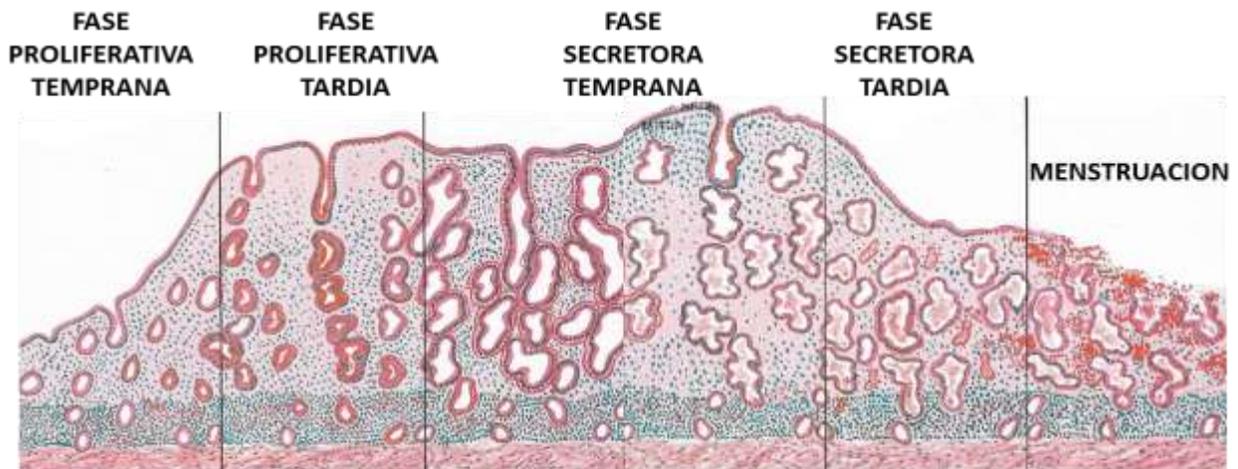


FIGURA 11: Modificación en estructura y altura del endometrio durante las distintas fases del ciclo endometrial. La LH domina en la fase secretora y de no darse el embarazo se presenta la menstruación.

Adaptado de Human implantation (p. 78) por Loke, Y.W.. 1995, Cambridge University Press

REGULACION HORMONAL DEL SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO

Existe una estrecha relación entre el sistema reproductor femenino en su conjunto y el sistema nervioso central, particularmente con el hipotálamo y la hipófisis.

El hipotálamo es una parte del sistema nervioso central, específicamente del diencefalo, que se sitúa por debajo del tálamo y arriba del quiasma óptico. Su volumen es de aproximadamente cinco cms³ y cumple con importantes funciones de homeostasis entre las que destacan funciones de regulación endocrina. Su estructura se compone de neuronas secretoras que forman grupos denominados núcleos hipotalámicos y cuyos axones sirven de vías de comunicación con la hipófisis. En total se reconocen 11 núcleos hipotalámicos (Low, 2011). Produce por lo menos nueve hormonas entre factores de liberación (*RH: releasing hormones*), factores de inhibición (*IF: inhibiting factors*) u hormonas de inhibición (*IH: inhibiting hormones*).

La hipófisis, o pituitaria, es una glándula de aproximadamente ½ gramo alojada en una depresión ósea del hueso esfenoides llamada silla turca que le brinda protección. Su estructura se compone de dos lóbulos: uno anterior o adenohipófisis y otro posterior o neurohipófisis.

En la adenohipófisis es posible distinguir tres zonas: la *pars tuberalis*, la *pars intermedia* que básicamente contiene a los melanotropos, secretores de *Hormona Estimulante de Melanocitos (MSH)*, y la *pars distalis* que representa el 80% de la glándula y que se compone de células secretoras que se denominan según la hormona que secretan: somatotrópas (*GH Growth Hormone/Hormona del Crecimiento*), lactotrópas (*PRL Prolactin/Prolactina*), corticotrópas (*ACTH Adrenocorticotrophic Hormone/Hormona Adrenocorticotrófica*), tirotrópas (*TSH Thyroid Stimulating Hormone/Hormona Estimulante de la Tiroides*) y gonadotrópas (*FSH y LH Follicle Stimulating Hormone/Hormona Folículo Estimulante y Luteinizing Hormone/Hormona Luteinizante*) (FIGURA 12).

La irrigación de la hipófisis está dada por la arteria hipofisaria superior e inferior (Debieve et al., 2000; Le Tissier et al., 2018).

En la región de la *pars tuberalis* la arteria superior forma un plexo capilar que constituye el llamado sistema porta-hipofisario el cual es fundamental para las funciones secretoras de la adenohipófisis.

En la neurohipófisis también se distinguen tres zonas: la eminencia media, conectada directamente con el hipotálamo, el tallo infundibular, que junto con la *pars tuberalis* forman el tallo hipofisario, y la *pars nervosa*.

A diferencia de la adenohipófisis, la neurohipófisis no cumple con funciones de secreción. Las terminales axónicas de las neuronas secretoras de los núcleos paraventricular y supraóptico desembocan en la *pars nervosa* y las neurohormonas producidas por estos núcleos, oxitocina y vasopresina, son almacenadas hasta su liberación en sangre frente a estímulos específicos (Debieve et al., 2000; Low, 2011).

La unidad formada por el hipotálamo y la hipófisis se conoce como sistema hipotálamo-hipofisario y la comunicación entre esta unidad y sus dianas se da por mecanismos de regulación positiva y negativa de asa larga, corta y ultracorta.

La retroalimentación negativa (RN) implica que la relación entre la señal y la respuesta es inversamente proporcional, a menor estímulo mayor producción, a mayor estímulo menor producción. En contraste, en la retroalimentación positiva (RP) la relación entre la señal y la respuesta es directamente proporcional, a mayor estímulo mayor producción, a menor estímulo menor producción.

El asa larga es la modalidad de retroalimentación negativa que dan las hormonas esteroideas circulantes sobre la hipófisis al ser ésta su glándula inductora y al actuar sobre sus receptores específicos en ella.

El asa corta es la retroalimentación negativa que da la hipófisis sobre el hipotálamo restringiendo la secreción de las hormonas liberadoras y el asa ultracorta es la retroalimentación negativa que ejerce el hipotálamo sobre sí mismo para detener la síntesis de las hormonas liberadoras (Brandan et al., 2011; Debieve et al., 2000; Grant & Vale, 1974; Le Tissier et al., 2018) (FIGURA 12).

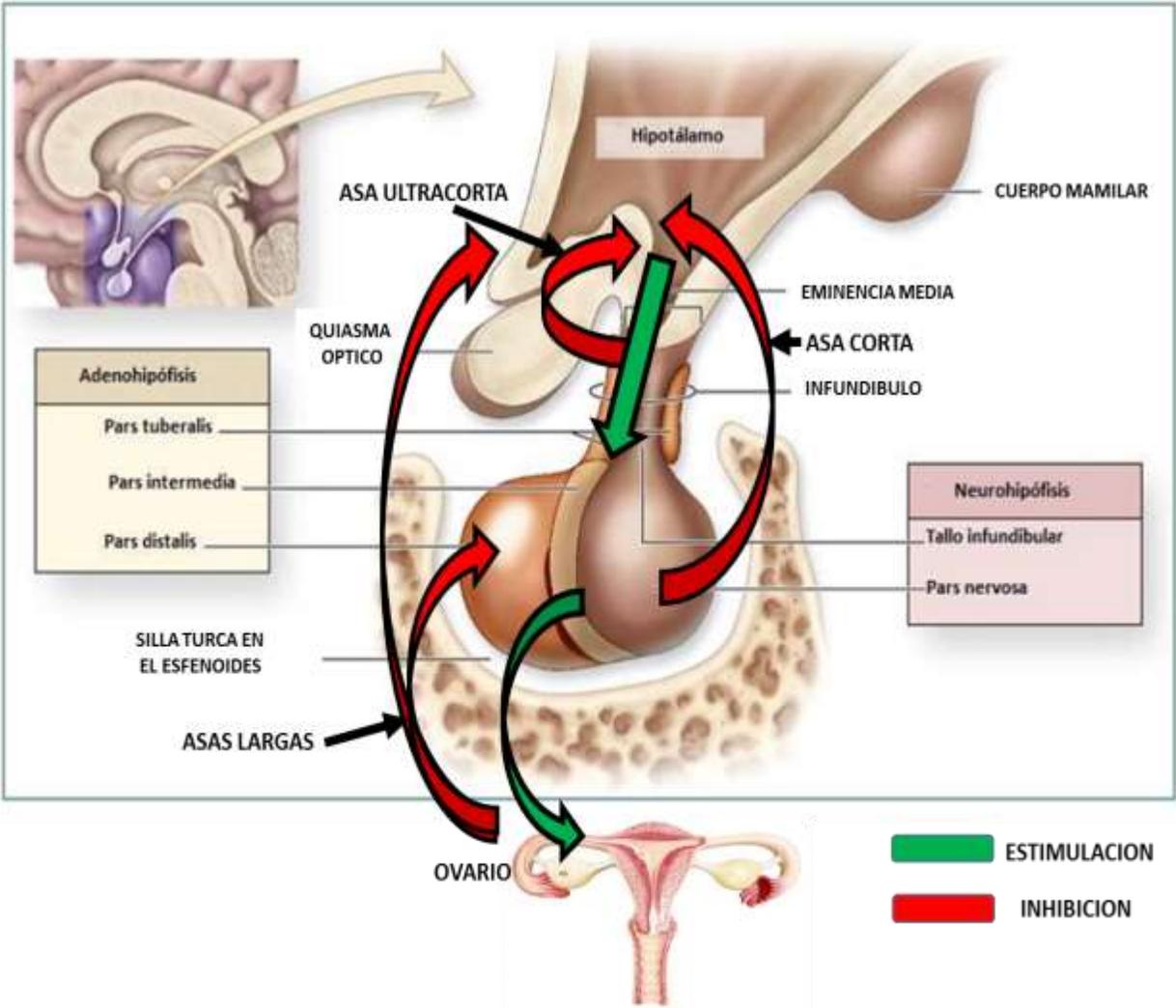


FIGURA 12: Anatomía de la Hipófisis. Destaca la estructura de ambos lóbulos y la retroalimentación negativa en sus 3 tipos de asas.
Adaptado de Hormonas hipotalámicas e hipofisarias (p. 8) por Brandan, NC. 2011, Facultad de Medicina; Buenos Aires, Argentina

HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GNRH)

La hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH (*Gonadotropin Release Hormone*) es un decapeptido producido por el núcleo arcuato hipotalámico que regula la función gonadal mediante el estímulo en las células gonadotrópas de la adenohipófisis para la síntesis y secreción de las gonadotropinas FSH y LH.

Los aminoácidos 1-6 y 10 son esenciales para la interacción con su receptor mientras que los aminoácidos 2 y 3 son responsables de la activación de los receptores (Debieve et al., 2000; Holesh et al., 2021; Low, 2011; Ulloa-Aguirre & Timossi, 2000).

Modificaciones en la estructura química de la molécula han dado lugar a la creación de agonistas y antagonistas de GnRH con los cuales puede manipularse la regulación hormonal en la mujer en preparación para algunos protocolos de estimulación ovárica (Al-Inany et al., 2005; Sealton et al., 1997).

Una vez producida por las neuronas del núcleo arcuato la GnRH es transportada por sus axones hasta la eminencia media donde pasa a la circulación por medio del sistema porta hipofisario que a su vez la libera en capilares fenestrados de la adenohipófisis entrando en contacto con sus receptores en los gonadotrópos. Después de fijarse a su receptor se induce una secreción bifásica de FSH y LH. La secreción selectiva se da en función de la frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH. Un pulso de alta frecuencia favorece la secreción de LH, mientras que un pulso de baja frecuencia incrementa la secreción de FSH (McCann et al., 2001; McLachlan et al., 1987).

Esta secreción se da mediante tres pasos:

1. Síntesis y almacenamiento de gonadotropinas en gránulos de reserva del aparato de Golgi de las células gonadotrópas.
2. Paso de gonadotropinas de los gránulos de reserva a gránulos de secreción.
3. Liberación de gonadotropinas de los gránulos de secreción a la circulación sanguínea.

La secreción de la GnRH no es continua pues tiene una vida media de entre dos a ocho minutos que obliga a pulsos de secreción a intervalos de 60 a 120 minutos. La generación de los pulsos rítmicos sucede en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Su rango de secreción en cantidad, frecuencia y amplitud es de 1 µg. por minuto durante 6 minutos cada 60 a 90 minutos en la mujer y cada 120 minutos en el hombre.

Sin embargo, las diferentes fases del ciclo ovárico pueden generar variaciones en la amplitud y la frecuencia de la secreción (Al-Inany et al., 2005; McLachlan et al., 1987; Sealton et al., 1997).

La regulación de la GnRH se da por esteroides sexuales a través de retroalimentación de asa larga; por las gonadotropinas hipofisarias a través de retroalimentación de asa corta y por su propia concentración en el hipotálamo mediante retroalimentación de asa ultracorta. Como las neuronas productoras de GnRH carecen de receptores a esteroides, se considera que la regulación ejercida por ellos se realiza a través de múltiples neurotransmisores (Sealton et al., 1997).

GONADOTROPINAS HIPOFISARIAS (FSH/LH)

La adenohipófisis secreta tres hormonas que son decisivas en el sistema reproductor femenino: FSH, LH y PRL. La FSH y LH son producto de la misma población celular en la adenohipófisis. Debido a la acción gonadal de estas hormonas y a su naturaleza trófica se les denomina conjuntamente como *Gonadotrofinas* o *Gonadotropinas*.

Tanto la FSH como la LH son moléculas de proteínas heterodímeras compuestas por dos cuerpos de polipéptidos unidos entre sí de forma no covalente por puentes sulfúricos y que se conocen como cadena α y cadena β . Las cadenas α de ambas hormonas son idénticas construidas por 92 aminoácidos. En contraste, la secuencia de aminoácidos de las cadenas β son distintas para cada gonadotropina: 111 aminoácidos para la FSH y 121 aminoácidos para la LH (*FIGURA 13*).

La cadena β confiere propiedades biológicas e inmunológicas únicas a cada hormona, así como especificidad en la unión al receptor de cada gonadotropina.

Existe evidencia que afirma que ambas cadenas son necesarias para establecer contacto con sus receptores y desencadenar una respuesta biológica (Ulloa-Aguirre et al., 1992; Ulloa-Aguirre, Maldonado, et al., 2001).

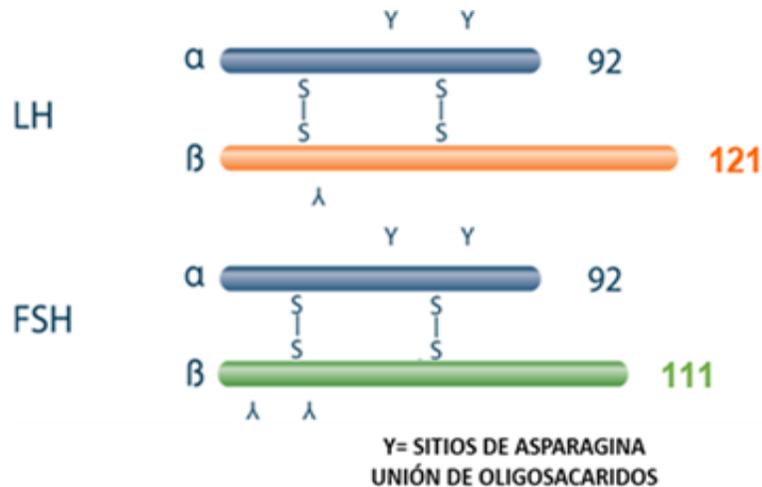


FIGURA 13: Estructura de las cadenas Alfa y Beta en la LH y en la FSH.
 Adaptado de *Endocrine Regulation of Gonadotropin Glycosylation* (p. 521) por Ulloa-Aguirre, A. 2001, *Arch Med Res* 32 (6)

Tanto en la cadena α como en la cadena β de la FSH existe una secuencia inicial de 24 y 18 aminoácidos respectivamente, que son responsables de generar la señalización con el receptor. En la cadena α de la FSH humana están ausentes 4 aminoácidos correspondientes a las posiciones 6, 7, 8 y 9 que, si se presentan en la FSH de otras especies, pero cuya ausencia no afecta de manera alguna a ninguno de los puentes disulfuro de la molécula.

Cada cadena, α y β , presentan un aminoácido Asparagina (Asn) en cada uno de sus extremos que sirve como sitio de unión para oligosacáridos a través de uniones covalentes (Ulloa-Aguirre & Timossi, 1998, 2000)(FIGURA 14).

A este proceso de unión entre proteína y carbohidrato se le denomina *Glicosilación*. Los cuatro sitios de glicosilación en la FSH son importantes componentes estructurales de la hormona representando entre el 20 y el 30% de su masa (Combarous, 1992; Ulloa-Aguirre et al., 1992; Ulloa-Aguirre & Timossi, 2000) (FIGURA 15).

La glicosilación es un proceso altamente complejo que tiene lugar en el aparato de Golgi en un momento posterior a la traducción de la síntesis proteica.

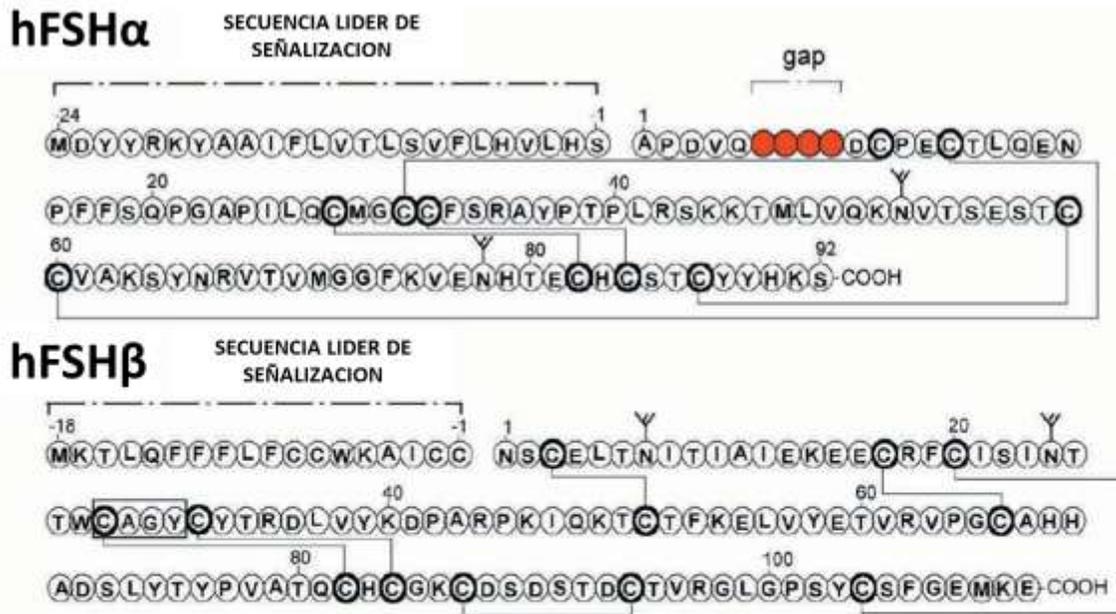


FIGURA 14: Estructura de las cadenas α y β de la FSH humana. Los anillos negros indican los extremos de anclaje de los puentes disulfuro en la molécula. Las estructuras similares a antenas indican los sitios de unión a oligosacáridos. Se pueden apreciar también las posiciones de aminoácidos ausentes en la FSH humana con respecto a la FSH de otras especies.

Adaptado de Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins (p. 53) por Ulloa-Aguirre, A. 2000; Reprod Biomed Online 1 (2)

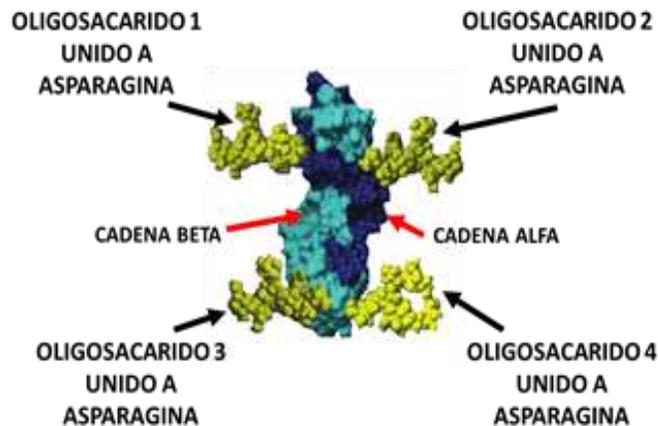


FIGURA 15: Estructura tridimensional de una molécula de FSH. Ambas cadenas de proteínas poseen 2 sitios para unión de oligosacáridos. Adaptado de Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone (p. 210) por Ulloa-Aguirre, A. 1999, Endocrine 11

Los oligosacáridos que se unen a la Asn en la glicosilación tienen una estructura química común que comprende dos residuos de N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa. Sin embargo, existe la intervención de diferentes enzimas, que después de la glicosilación, catalizan un proceso secundario de maduración en el que a cada oligosacárido pueden sumarse otros oligosacáridos como la manosa, galactosa, fructuosa, glicosamina o galactosamina.

Esto hace que la mayor parte de los oligosacáridos adopte una estructura biantenaria, pero es posible observar estructuras tri y tetra antenarias. A estas estructuras se agregan cantidades variables de sulfatos o de ácido siálico como residuos finales denominándose a este proceso *Sialilación* (Combarnous, 1992; Ulloa-Aguirre, Maldonado, et al., 2001) (FIGURA 16).

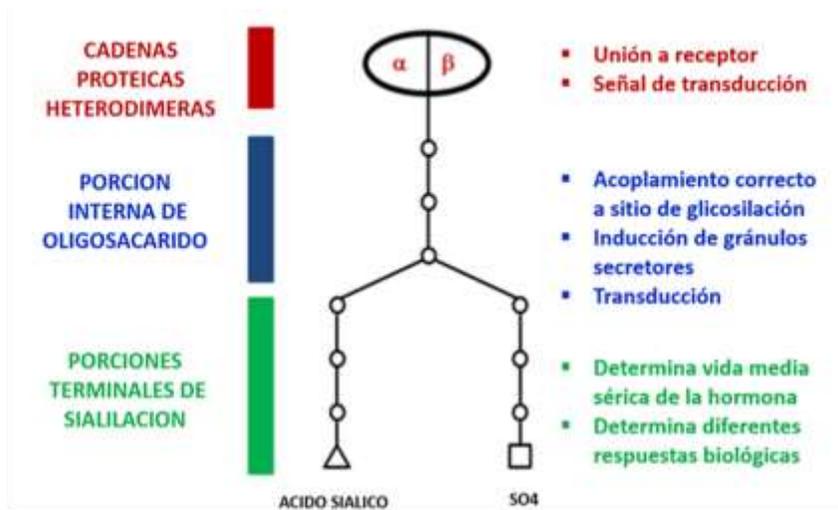


FIGURA 16: Estructura de la molécula de FSH posterior a la Glicosilación y la Sialilación.
Adaptado de Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives (p. S16) por ASRM 2008, Fertil Steril 90 (5)

Los diferentes grados de glicosilación y de sialilación de la FSH dan lugar a variantes moleculares de la hormona que se denominan *Glicofomas* o *Isoformas* de FSH (Ulloa-Aguirre, Maldonado, et al., 2001).

La existencia de estas isoformas de FSH es muy relevante porque muestran una distinta duración en la acción hormonal, así como una diferente estabilidad en el complejo receptor-hormona, pero quizá la característica más sobresaliente es que inducen distintas respuestas biológicas en las células gonadales.

La vida media de la FSH es de tres a cuatro horas y la de la LH es de 20 a 30 minutos.

En condiciones fisiológicas ninguna se secreta individualmente y su actividad biológica se determina tanto por las proporciones relativas de otras hormonas como por el estado del efector (Ulloa-Aguirre et al., 1992).

Importancia de las isoformas de FSH

El grado de glicosilación y de sialilación en las moléculas de FSH son los responsables de la generación de las distintas isoformas de la hormona. Naturalmente, la FSH tiene de una a tres terminales de ácido siálico en su estructura. Las isoformas con mayor cantidad de residuos siálicos son consideradas más ácidas y, por el contrario, las isoformas con menor cantidad de residuos siálicos se consideran más básicas.

Esto tiene importantes implicaciones en el funcionamiento biológico de las diferentes isoformas (Combarous, 1992; Ulloa-Aguirre et al., 1992). Las isoformas ácidas muestran mayor estabilidad, poseen una vida media más larga y tienen un mayor tiempo de aclaramiento sérico, mientras que las isoformas básicas tienen una mayor afinidad y unión al receptor para FSH y poseen efectos proliferativos sobre las células de la granulosa (Knobil, 1980; Ulloa-Aguirre, Maldonado, et al., 2001; Vitt et al., 1998) (FIGURA 17).

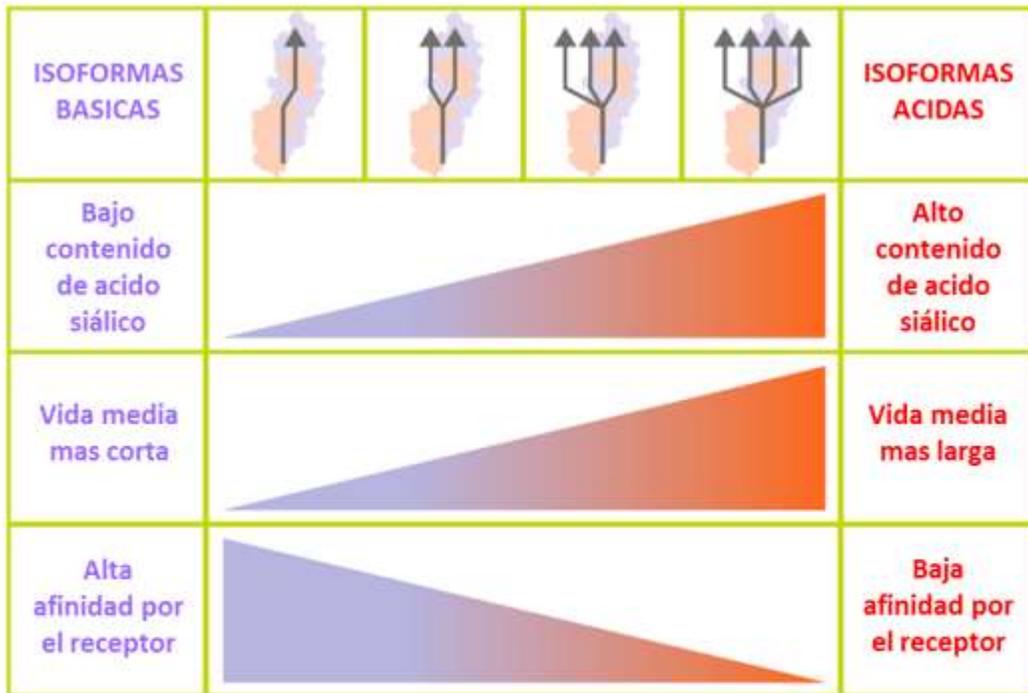


FIGURA 17: Diferentes isoformas de FSH. Las propiedades son distintas en función de la cantidad de acido siálico en la estructura.
 Elaborado a partir de *Isoforms of Human Recombinant Follicle-Stimulating Hormone* (p. 857-858) por Vitt, U.A. 1998, *Biol Reprod* 59

De forma natural la hipófisis secreta una mezcla heterogénea de isoformas de FSH que va cambiando a lo largo de un ciclo menstrual por acción de la concentración sérica del estradiol. Esta variación obliga a que la actividad de la FSH en este mismo periodo también sea cambiante (Ulloa-Aguirre et al., 1992, 2003; Ulloa-Aguirre, Timossi, et al., 2001) (FIGURA 18).

Es sabido que las isoformas básicas inducen una mayor secreción de estradiol en comparación con las isoformas ácidas y esto explicaría entonces la caída estrogénica en la pre, peri y pos menopausia pues la secreción de FSH tiende a ser predominantemente ácida en esta etapa (Combarous, 1992; Ulloa-Aguirre et al., 1992, 2003; Ulloa-Aguirre, Maldonado, et al., 2001).

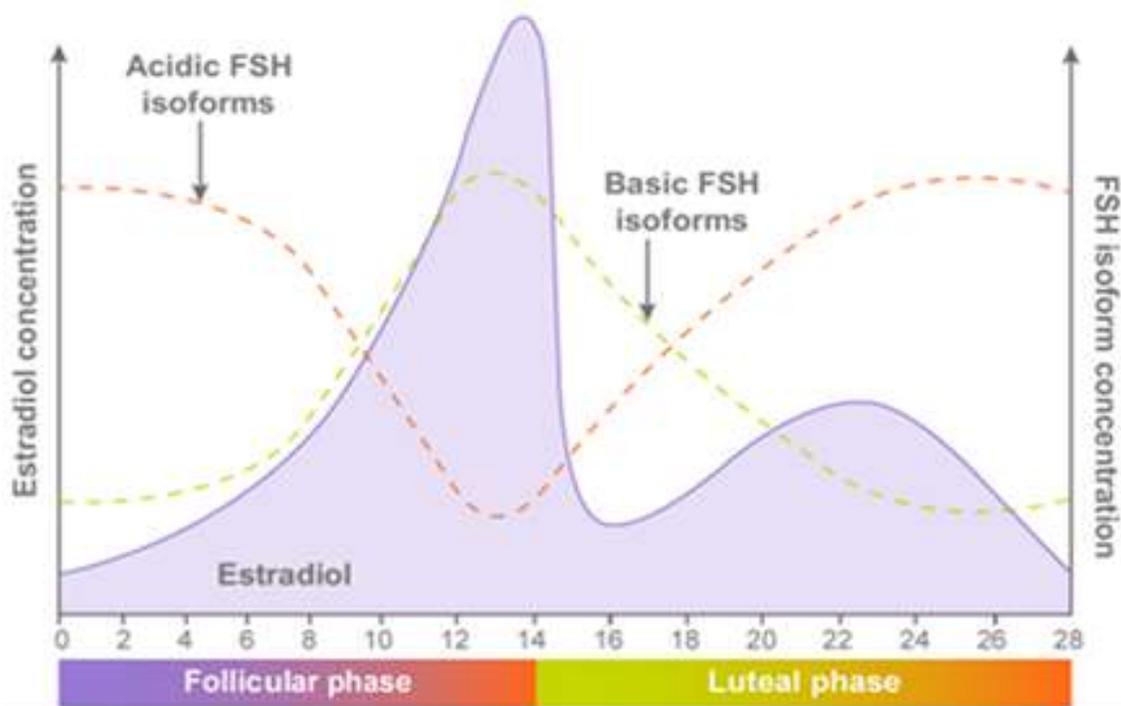


FIGURA 18: Cambios en la proporción de isoformas ácidas y básicas a lo largo del ciclo menstrual.

Adaptado de Follicle-stimulating hormone: A review of form and function in the treatment of infertility (p. 4) por Smitz, J. 2015, Reprod Sci 1 (11)

La LH también experimenta glicosilación y sus moléculas pueden portar uno o dos residuos de ácido siálico. Al igual que en la FSH las unidades de carbohidratos que glicosilan las moléculas son manosa, galactosa, fructuosa, glicosamina, galactosamina y ácido siálico o neuramínico como carbohidratos finales. La vida media de la LH es de 20 a 30 minutos (McCann et al., 2001).

La LH es una hormona de equilibrio para diferentes procesos en el ciclo menstrual. Mientras la FSH y el E2 promueven la expresión de receptores para FSH y LH, la LH y los andrógenos inhiben la síntesis de esos receptores.

Todo debe suceder en momentos específicos del desarrollo folicular para favorecer el desarrollo óptimo de solo un folículo dentro de una cohorte más numerosa.

La FSH favorece el crecimiento y desarrollo de los folículos en el ovario y facilita algunos cambios bioquímicos como aumento en la captación de oxígeno e inducción de la síntesis proteica, pero todo ello sucede solo en presencia de la LH en concentraciones muy específicas (Ulloa-Aguirre, Timossi, et al., 2001).

La LH es clave en la esteroidogénesis en las células del cuerpo lúteo, de la granulosa, de la teca interna y del estroma y para lo cual se requiere una concentración basal muy específica. Entre otras de sus funciones esta la conversión del colesterol en pregnenolona, una prohormona que da lugar a la progesterona. Induce también hiperemia en el ovario, un aumento del flujo sanguíneo que es crítico para llevar metabolitos esenciales a los órganos efectores. Participa en la reactivación de la meiosis del ovocito y en la adquisición de la capacidad ovulatoria en el folículo (Niswender, 2003).

REGULACIÓN ENDOCRINA DEL CICLO MENSTRUAL

Los mecanismos de retroalimentación positiva y negativa para la regulación de las gonadotropinas son modulados por el estradiol, cuya fuente principal es el folículo ovárico dominante (Knobil, 1980).

Este último ha expresado receptores para FSH durante su desarrollo en la membrana de las células de la granulosa y receptores para LH en la membrana de las células de la teca interna.

Debido a la contigüidad entre ambos tipos celulares existe un estrecho contacto y se establecen vías de interacción química responsables de la producción del E2. A esta interacción celular se le ha denominado *Modelo de la doble célula* (Chin, 2004; Havelock et al., 2004; Niswender, 2003) (FIGURA 19).

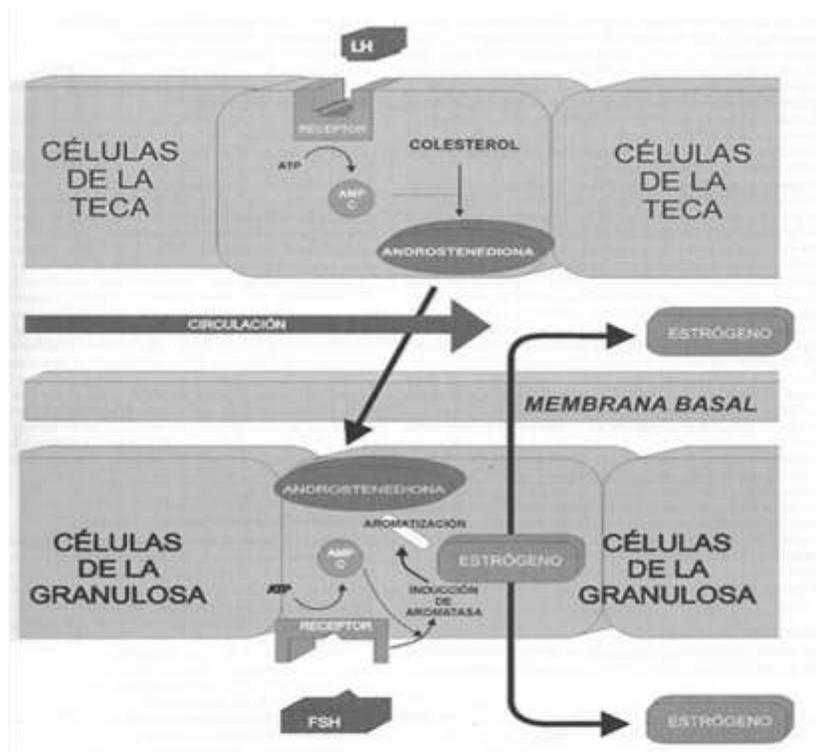


FIGURA 19: Modelo de la Doble Célula. La acción conjunta de la FSH y la LH es la responsable de la aromatización del precursor androgénico androstenediona para la producción de estrógenos.
 Adaptado de Atención integral de la infertilidad 3ª ed. (p. 303) por Pérez Peña, E. 2019, Panamericana

Las células de la teca interna no poseen o tienen niveles muy bajos de Aromatasas, enzimas específicas para la conversión de andrógenos en estrógenos mediante un proceso bioquímico denominado aromatización.

Las células de la granulosa por su parte no poseen la enzima 17-20 desmolasa que se necesita para producir andrógenos a partir del colesterol. Todo lo anterior implica que se requiere la participación compensada de ambos tipos celulares para producir localmente estrógenos (Eppig et al., 1997; Gosden et al., 2002).

En las células de la teca interna, la interacción de la LH con su receptor induce la conversión del ATP (Adenosín Tri Fosfato) en cAMP (Adenosín Mono Fosfato cíclico) el cual estimula la secreción de androstenediona sintetizada a partir del colesterol.

La androstenediona difunde a través de la membrana basal del folículo y entra en contacto con las células de la granulosa. De forma paralela, en las células de la granulosa, la interacción de la FSH con su receptor y la posterior conversión del ATP en cAMP, induce la actividad de las aromatasas y con ello la conversión de la androstenediona en estrógenos. Los estrógenos así formados se liberan en el líquido folicular y en la circulación general (Niswender, 2003) (FIGURA 19).

Fase folicular temprana. Día 1 del ciclo menstrual.

Hacia el final de un ciclo previo en el cual no se dio el embarazo, la función del cuerpo lúteo declina y con él cae la concentración sérica de E2 mientras que la FSH comienza a elevarse por RN aproximadamente dos días antes de iniciar la menstruación. En el inicio del nuevo ciclo los niveles de E2 e IA son muy bajos y la FSH mantiene niveles más elevados que la LH. A pesar de lo anterior el desarrollo folicular inicial se da independientemente de las gonadotropinas.

Posteriormente, la acción conjunta de la LH y la FSH en el folículo condicionan una nueva elevación autocrina del E2 (modelo de la doble célula) que presenta una correlación directa con el desarrollo del folículo dominante y que representa la suma de los folículos en crecimiento.

Los efectores para FSH son las células de la granulosa mientras que para LH lo son las células tecales. Por RP la elevación del E2 induce también mayor elevación de la LH con alta frecuencia y baja amplitud por un periodo aproximado de cinco días (Ferín, 1996; Rebar, 1995).

Fase folicular tardía. Día 6 del ciclo menstrual.

Hacia la segunda mitad de la fase folicular, el E2 adquiere una gran importancia por las diversas funciones que cumple. La estimulación autocrina de los receptores para E2 en el folículo favorece la síntesis de receptores adicionales permitiendo una mayor sensibilidad estrogénica que conjuntamente a la FSH estimularán la actividad mitótica de las células de la granulosa con el consiguiente crecimiento folicular.

Posteriormente suprime la producción de FSH a nivel central impidiendo con ello el desarrollo del resto de los folículos de la cohorte y favoreciendo la dominancia de solo uno. El E2 también induce la expresión de receptores para LH en las células de la granulosa que bajo estímulo iniciarán la secreción de progesterona. Adicionalmente, estos receptores permiten al folículo continuar su desarrollo cuando la FSH inicia su decremento y le confieren la capacidad ovulatoria.

Por todo lo anterior, el folículo con mayor expresión de receptores FSH-LH, y por tanto con mayor sensibilidad a estas hormonas con respecto al resto de su cohorte, será el que adquiera la dominancia y evite la atresia.

En esta etapa la PRL también influye en la secreción de progesterona necesitando ciertos rangos críticos para dar una influencia positiva ya que niveles más altos o más bajos inducen su supresión. Conforme la fase folicular se acerca a su término los niveles de FSH empiezan a declinar mientras que los de LH tienden a incrementarse. La secreción de estrógenos y andrógenos crece hasta alcanzar un pico máximo que se registra un día antes del pico de la LH que se da por RP. En esta etapa el E2 también es responsable de incrementar la bioactividad de la LH (Niswender, 2003; Speroff & Fritz, 2005).

A nivel periférico la androstenediona circulante es convertida en Estrona (*E1*), el segundo esteroide más importante en la mujer, y que contribuye a potencializar el efecto del E2 y por consiguiente de la LH. A medida que se incrementa el E2 se registra una caída de la FSH por RN. Otras hormonas como la Inhibina A y la Folistatina, producidas por el folículo ovárico, potencializan la inhibición de la FSH (Rebar, 1995; Speroff & Fritz, 2005).

Fase ovulatoria. Día 14 del ciclo menstrual.

El pico de E2 del folículo dominante precede al pico de LH por 14-24 horas que a su vez precede en 10-12 horas a la ovulación. Muy poco antes de la ovulación el E2 cae súbitamente y la FSH tiene aumentos discretos, mientras que la progesterona empieza a elevarse.

La LH además de sus efectos esteroideos participa en la rotura folicular y en el reinicio de la división meiótica en el ovocito (Ferin, 1996; Rebar, 1995; Speroff & Fritz, 2005).

Fase lútea. Aproximadamente del día 15 al 26 del ciclo menstrual.

El rasgo más notable de esta fase es el incremento significativo de la progesterona producida por el cuerpo lúteo que alcanza un pico máximo aproximadamente ocho días después del pico de LH.

En forma paralela se incrementan también el E2, la E1, la IA y la 17-OHP (*17-hidroxiprogesterona*) aunque en menor magnitud. Todos estos cambios endocrinos significan la disminución de la FSH y de la LH (Niswender, 2003).

Una vez llegado el pico de progesterona se da la llamada ventana de implantación, que dura aproximadamente tres días, y representa el momento de mayor receptividad del endometrio para recibir al blastocisto (Ferin, 1996). La LH tiene ahora pulsos de baja frecuencia y alta amplitud, pero su tendencia es hacia la baja junto con la FSH y se mantendrán así hasta el final de ciclo cuándo volverán a elevarse para iniciar la nueva fase folicular del siguiente ciclo.

Hacia el final de la fase lútea, y en ausencia de embarazo, el E2 y la progesterona también disminuyen sus concentraciones debido a la declinación funcional del cuerpo lúteo (Niswender, 2003; Rebar, 1995).

Fase menstrual o de transición lúteo-folicular. Últimos días del ciclo.

Dos días antes de la menstruación la Inhibina A decae liberando el freno que impedía la secreción de FSH que comienza a elevarse estimula la producción de Inhibina B (*IB*). La LH también se ve liberada y cambia a pulsos de alta frecuencia y baja amplitud (Ferin, 1996; Niswender, 2003). La regulación endocrina del ciclo menstrual impacta sobre el ciclo ovárico y el ciclo menstrual e incluso sobre la temperatura corporal basal (*FIGURA 20*).

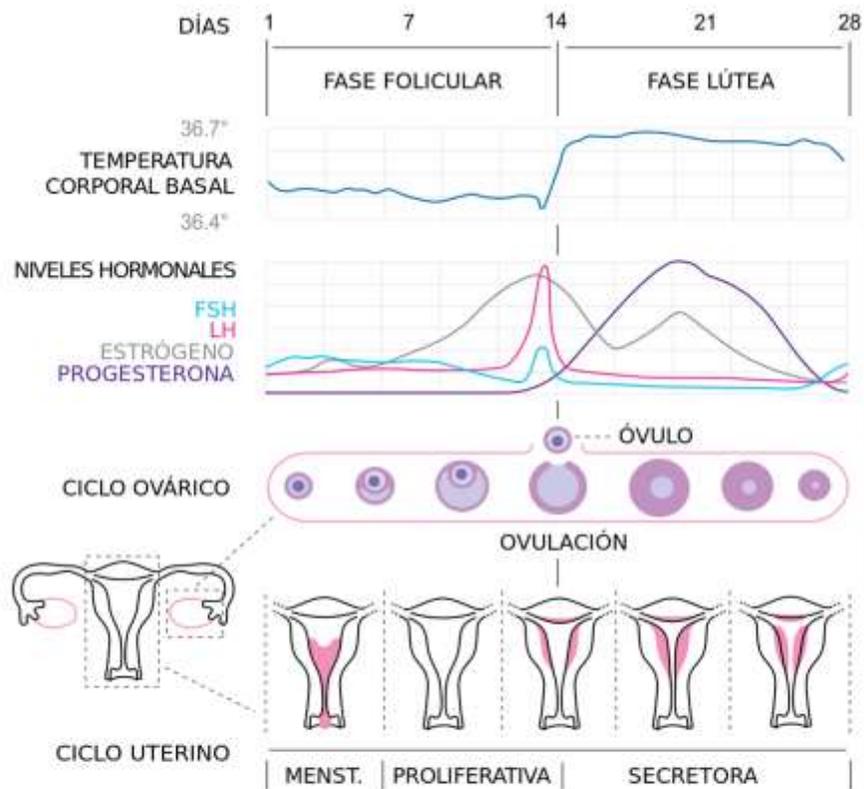


FIGURA 20: Ciclo Menstrual: Ciclo Ovárico y Ciclo Endometrial.
Fluctuaciones hormonales normales durante el ciclo.
 Adaptado de *Reproductive endocrinology, surgery and technology* (p. 110) por
 Ferin, M.J. 1996, Lippincott-Raven Publishers

INFERTILIDAD

DEFINICIONES DE INFERTILIDAD Y DATOS NACIONALES

Dada la extraordinaria complejidad de la fisiología reproductiva femenina y la gran cantidad de factores que deben funcionar de forma sincrónica, es sencillo entender que cualquier alteración en alguno de estos niveles conducirá a dificultades reproductivas dando lugar a una condición de Infertilidad.

Los términos Infertilidad y Esterilidad comúnmente son usados de forma indistinta haciendo confusa su aplicación. La esterilidad se asocia a una connotación irreversible o absoluta, mientras que el término infertilidad se liga a una susceptibilidad de corrección. De hecho, las clínicas de atención particular y los diferentes programas de asistencia, prefieren el uso de este término en la descripción de su labor precisamente porque brindan opciones de tratamiento.

En el 2006, el comité de prácticas de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (*ASRM, American Society of Reproductive Medicine*), consensuó la definición del término infertilidad que quedaría aceptada internacionalmente hasta el día de hoy y según la cual Infertilidad “*es la incapacidad de una pareja para lograr un embarazo después de un año de vida sexual activa sin el uso de ningún método anticonceptivo*” (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008).

Un acuerdo adicional estableció que el término infertilidad quedaría asentado como el único término aplicable a una condición de incapacidad reproductiva eliminando el de esterilidad.

En contra parte, fertilidad se definió como la capacidad de concebir en un determinado lapso de tiempo mientras que fecundidad como la capacidad de concebir en un determinado lapso de tiempo logrando además un producto vivo (González & Serrano, 2010; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2008).

Alrededor de una condición de infertilidad existen otros aspectos relacionados que conviene definir claramente con la finalidad de lograr una mejor categorización del problema reproductivo y por ende de las opciones de manejo disponibles. Esto da lugar a una sub clasificación en infertilidad en la que se define como infertilidad primaria a aquella condición en la que nunca se ha logrado un embarazo, infertilidad secundaria a la incapacidad reproductiva que se presenta después de embarazos previos, incluidos abortos espontáneos, e infertilidad idiopática o inexplicable a la incapacidad reproductiva en la que no es posible determinar ninguna condición causal (González & Serrano, 2010).

La incidencia de la infertilidad va en aumento a nivel mundial con cifras que varían entre el 15 y el 20% (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama, 2008; Vite Vargas et al., 2005).

En el caso de México existen varias limitaciones para conocer con precisión la incidencia global de la infertilidad en la población en edad reproductiva, pero quizá la más significativa sea la indiferencia gubernamental para atender una problemática considerada como suntuosa y que no representa un riesgo para la vida de quien la padece (Vite Vargas et al., 2005).

Esto ha obligado a que la atención de la infertilidad sea predominantemente particular y que las clínicas donde se maneja mantengan una actitud de hermetismo y escasez en la información compartida de su casuística y resultados reales.

Aunque en México existe un alto índice de crecimiento poblacional existen datos que permiten suponer que 15% es una cifra muy próxima a la realidad y cuya prevalencia aumenta por las tensiones y presiones del mundo moderno en el aspecto ambiental, social y personal (Santos-González, 2003).

En las sociedades modernas la participación plena y equitativa de las mujeres en todos los ámbitos sociales, incluido el académico, ha dado lugar a la postergación de la maternidad hasta edades más avanzadas después de culminadas metas personales, académicas, económicas o sociales.

Desgraciadamente, esto da lugar a una de las causas de infertilidad más frecuentemente observada: la edad (González & Serrano, 2010).

En la mujer la fertilidad es máxima durante una pequeña ventana de tiempo que se da entre los 24 y los 26 años de edad después de la cual empieza a declinar de forma gradual a partir de los 30 años, acentuándose a los 35 y siendo muy notoria a partir de los 37 años de edad. Una tercera parte de las mujeres con 30 años o más cursan con infertilidad y esta proporción sube al 50% si se rebasan los 40 años de edad. La causa que se observa con mayor frecuencia son fallos en la ovulación o en la viabilidad de los óvulos, trastorno conocido como *factor ovárico*, y que tiene una relación directamente inversa entre la edad y la reserva ovárica de la mujer (Peña, 2019).

Aunado a lo anterior está demostrado que entre 10 y 15 años previos a la menopausia existe una pérdida acelerada de óvulos y en México los datos epidemiológicos disponibles indican que la menopausia se presenta en una edad promedio de 47 a 49 años (Santos-González, 2003; Vite Vargas et al., 2005). Con la edad también aumenta la incidencia de abortos espontáneos: 10% a los 30 años o más, 34% entre los 35 y 40 años y 75% arriba de los 40 años (Verhoeve et al., 2006).

Están reconocidas otras múltiples causas de infertilidad en la mujer que, a diferencia de la edad que afecta a un claro sector de la población, pueden presentarse en cualquier grupo etario. Además del factor ovárico, que implica que por diversas condiciones existe una alteración en la producción de un ovulo con la capacidad de ser fecundado, pueden existir alteraciones en la permeabilidad de las tubas uterinas lo que obstaculizará el encuentro de los gametos al no existir un paso libre. A esta condición se le conoce como *factor tubo peritoneal*. Si las alteraciones están en el útero, alteraciones anatómicas o funcionales, se trata de un *factor uterino*, pero si las condiciones vaginales no son las adecuadas por procesos inflamatorios, infecciosos o neoplásicos estamos frente a un *factor cervico-vaginal*.

No son raras las afectaciones a nivel central que incluso pueden ser la causa subyacente de un fallo ovárico o de la función endometrial. Esto constituye el *factor neuroendocrino* (Peña, 2019).

En el caso del varón hoy se reconoce que la mitad de las causales de infertilidad en una pareja residen en el hombre lo que se denomina *factor masculino*. Sin embargo, la infertilidad en el hombre está muy concentrada solo en la calidad seminal lo cual incluye factores de volumen, densidad, viabilidad, movilidad y morfología espermática (Organization, 2010).

Es reconocido que en los últimos 50 años el conteo espermático en el hombre ha disminuido (González & Serrano, 2010). Otras causas de infertilidad que afectan a mujeres y hombres por igual son el uso indiscriminado de anticonceptivos, la mayor incidencia de enfermedades venéreas, automedicación, obesidad, dietas demasiado restrictivas, rutinas de ejercicio extenuante, exposición a tóxicos ambientales (pesticidas, solventes, plomo, gases, pinturas, radiación, etc.) o drogadicción en cualquiera de sus variantes (Peña, 2019).

Cada una de las causas de infertilidad tiene un abordaje y un tratamiento específicos que busca solucionar el impedimento e incrementar las posibilidades de lograr un embarazo y ya que el derecho a la vida es uno de los principios básicos del ser humano, la ciencia actual cuenta con diversas técnicas para asistir en la reproducción de una pareja aquejada por infertilidad. Estas técnicas se conocen de forma global como *Técnicas en Reproducción Asistida*.

TÉCNICAS EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Las técnicas en reproducción asistida (TRA) constituyen todos los procedimientos que facilitan la interacción entre los gametos masculino y femenino para favorecer la oportunidad de fertilización e incrementar la posibilidad de un embarazo (González & Serrano, 2010).

Las TRA son procedimientos llevados a cabo por médicos ginecólogos y un laboratorio de manipulación de gametos que idealmente debe ser manejado por un biólogo formado en biología reproductiva y con destreza en la manipulación de tejidos y células.

Hoy en día se dispone de diversas modalidades de TRA, más o menos complejas, en función de la causa de infertilidad que se presente.

Esto da lugar a tres categorías: técnicas de baja, moderada y alta complejidad, pero independientemente de cual sea la técnica utilizada, todas tienen en común la necesidad de sobre estimular endocrinamente al ovario, un procedimiento denominado *hiperestimulación ovárica controlada (HOC)*, con la finalidad no solo de asegurar el crecimiento y desarrollo del folículo y del ovocito sino también de incrementar las probabilidades de éxito en la consecución de un embarazo al incrementar el número de óvulos potencialmente fecundables por ciclo (Díaz, 2007; González & Serrano, 2010; Kably Ambe et al., 2012).

Técnicas de baja complejidad

Las técnicas de baja complejidad están indicadas cuando la causa de infertilidad es un factor cervico-vaginal o un factor masculino. Son útiles también en situaciones de bajo rendimiento sexual masculino (edad o incapacidad eréctil).

La base de estas técnicas consiste en aumentar la concentración de gametos en las tubas uterinas e incrementar las posibilidades de fertilización e implantación (Peña, 2019).

De forma inicial, las técnicas de baja complejidad requieren de HOC para obtener más de un ovulo maduro capaz de ser fecundado. No requieren de procedimientos quirúrgicos ni de hospitalizaciones y pueden ser realizadas en un consultorio e incluso en el domicilio de la pareja por lo que solo intervienen el médico tratante y el laboratorio de gametos (Kably Ambe et al., 2012).

Por ser técnicas de baja complejidad el objetivo de la HOC es obtener no más de dos o tres óvulos maduros y después de las aplicaciones hormonales se da seguimiento por ultrasonido y mediciones hormonales periódicas al crecimiento y desarrollo folicular.

En función del momento previsto de la ovulación se puede optar por diferentes técnicas:

Coito programado

Esta es la modalidad más simple dentro de las TRA. No se requiere de la manipulación externa de gametos solo de la inducción hormonal para posteriormente programar una relación sexual en los días periovulatorios, los llamados días fértiles (Peña, 2019).

Inseminación intrauterina (IIU)

Entre cuatro y cinco horas previas a la ovulación se debe obtener una muestra de semen por masturbación que puede ser de la pareja de la mujer en tratamiento, semen homólogo (*IAH: Inseminación Artificial Homóloga*), o de donador, semen heterólogo o de donante (*IAD: Inseminación Artificial de Donador*). En la IAH el semen debe ser obtenido después de un periodo de abstinencia de entre tres a siete días y debe procesarse antes de ser utilizada con el objetivo de mejorar las características seminales e incrementar las posibilidades de fertilización (Kably Ambe et al., 2012).

Inicialmente se toma una pequeña muestra del eyaculado total y se realiza una Espermatobioscopía o Seminograma el cual es un análisis que consta de la evaluación de parámetros físicos y características microscópicas que en conjunto brindan un panorama de la calidad y la viabilidad seminal.

Físicamente se evalúa el volumen del eyaculado, su color, consistencia, olor, pH, viscosidad y tiempo de licuefacción, es decir, el tiempo que tarda en degradarse el coágulo seminal. Microscópicamente, se evalúa la densidad espermática por mililitro, la vitalidad (proporción de espermatozoides vivos), su morfología, su patrón de movilidad, la presencia o no de aglutinación y la presencia o no de bacterias.

La espermatobioscopía es un estudio que no solo permite categorizar la calidad del semen pues los parámetros que evalúa le dan también cierto potencial diagnóstico al identificar si existe o no algún factor masculino.

El tipo específico se define según los criterios de la OMS (Kably Ambe et al., 2012; Organization, 2010):

- Normozoospermia: eyaculado normal sin alteraciones mayores
- Hipospermia: bajo volumen de eyaculado (-1.5 ml.)
- Oligozoospermia: concentración espermática $< 20 \times 10^6$ /ml.
- Teratozoospermia: < 30 millones de espermatozoides normales
- Astenozoospermia: $< 50\%$ de espermatozoides con progresión lineal
 $< 25\%$ de espermatozoides con progresión lineal rápida
- Azoospermia: ausencia de eyaculado
- Oligoastenoteratozoospermia: alteración en los tres niveles

En baja complejidad solo el semen con normozoospermia, hipospermia u oligozoospermia es factible de ser procesado exitosamente. El resto de las categorías puede obligar a pasar de baja a moderada o alta complejidad.

El resto del eyaculado debe ser "lavado" para lo cual se emplea una técnica denominada *swim-up* (Berg et al., 1997; Organization, 2010). Esta técnica requiere del uso de diversos medios de cultivo que permitan la sobrevivencia de los espermatozoides. Uno de los medios de cultivo más utilizado es el *Human Tubal Fluid (HTF)*, que según lo indica su nombre, asemeja el medio ambiente de las tubas uterinas. La muestra de semen se reconstituye en el medio de cultivo seleccionado en un tubo de ensayo para después centrifugarlo y separar a las células del plasma seminal. Esto se repite una vez más de tal forma que se eliminan detritus, espermatozoides inmóviles, muertos, anormales incapaces de fertilizar, proteínas antigénicas y leucocitos que son potenciales liberadores de especies reactivas de oxígeno las cuales actúan negativamente sobre los espermatozoides normales.

Con la interacción que se da entre los espermatozoides y el medio de cultivo al desplazarse por la centrifugación se imita la interacción natural que experimenta la membrana celular del espermatozoide con los fluidos uterinos al desplazarse por sus paredes para alcanzar al óvulo.

Está plenamente demostrado que esta interacción genera cambios funcionales que les permiten adquirir su capacidad fecundativa mediante una hiperpolarización de sus membranas celulares e incremento del calcio intracelular.

La adquisición de estos cambios se conoce en conjunto como *capacitación espermática* e incluyen la modificación del patrón de movilidad que pasa de ser errático a progresivo y oscilante, así como modificaciones en la membrana acrosomal del espermatozoide lo que le confiere la capacidad de fusión con el ovulo y la posterior reacción acrosomal y liberación enzimática (Villanueva Díaz et al., 1989).

Concluida la centrifugación, se retira el medio de cultivo del tubo de ensayo y se deposita una nueva cantidad sobre el paquete celular resultante. El tubo se coloca inclinado a 45° en una incubadora a 37° C por 30 minutos.

La solución final muestra una alta densidad espermática con espermatozoides de alta movilidad progresiva y de morfología normal según los criterios de la OMS (Organization, 2010) y de ella son tomados aproximadamente 0.5 ml. que se depositan en la cavidad uterina mediante un catéter atóxico de transferencia embrionaria.

En la IAD el semen a utilizar proviene de criopreservación por lo que antes de realizar todo el procesamiento antes descrito debe seguirse un protocolo específico de descongelación y recuperación celular (Peña, 2019).

Perfusión espermática tubaria (PET)

Se trata de una IUI modificada en la cual la inseminación se hace con un mayor volumen de solución espermática, previamente capacitada, que se deposita en las tubas uterinas y no dentro en la cavidad uterina.

Con esta modificación el objetivo que se persigue es ubicar en mayor proximidad a los espermatozoides con respecto al ovulo.

Es una técnica infrecuente, pero poco invasiva y exitosa (Peña, 2019).

Técnicas de moderada complejidad

Las técnicas de moderada complejidad están indicadas cuando se presentan uno o más de los factores restantes de infertilidad.

Su grado de complejidad se debe a que se utilizan técnicas quirúrgicas invasivas o instrumentales con tecnología avanzada que tienen por objetivo incrementar significativamente la posibilidad de fertilización e implantación (González & Serrano, 2010; Peña, 2019).

A diferencia de la baja complejidad, estas técnicas requieren de la manipulación externa de ambos gametos y son realizadas por grupos multidisciplinarios que se dividen entre un quirófano y el laboratorio de gametos. Pueden participar el ginecólogo tratante, un ginecólogo de apoyo, un anestesiólogo, un ultrasonografista y personal de enfermería y asistencia.

En el laboratorio de gametos puede ser necesaria la presencia de dos biólogos. La HOC también es fundamental, pero su objetivo cambia al necesitarse entre seis y diez óvulos maduros por ciclo (Peña, 2019). El seguimiento al crecimiento y desarrollo folicular se hace igualmente por ultrasonido y mediciones hormonales, pero una vez alcanzado el desarrollo óptimo, los óvulos son extraídos por aspiración mediante *punción ovárica* realizada a través de una técnica quirúrgica de mínima invasión llamada *laparoscopia* que es guiada por ultrasonido.

El aspirado ovárico es enviado al laboratorio de gametos donde el biólogo se encarga de identificar a los óvulos, retirar el exceso de células del estroma y de la granulosa y acondicionarlos en medios de cultivo lo que implica colocarlos en cajas de Petri individuales con medio de cultivo estéril a 37°C de temperatura y con una humedad relativa del 95% (Peña, 2019).

La preparación del semen sigue idénticas indicaciones que las descritas en baja complejidad y solo ante la presencia de algún factor masculino específico puede ser necesario algún procesamiento adicional. La decisión de la pareja por elegir el sexo del producto también condiciona procesos adicionales sobre el semen.

Con los espermatozoides ya capacitados y recuperados y los óvulos mantenidos en condiciones de cultivo ya es posible optar por alguna técnica de moderada complejidad:

Transferencia Intratubaria de gametos (GIFT)

Los óvulos y los espermatozoides se unen minutos antes de la transferencia con el objetivo de que pueda darse la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovulo. Posteriormente se hace la transferencia al interior de una o de ambas tubas uterinas para permitir condiciones de fertilización prácticamente idénticas al proceso natural. Esta técnica está indicada para mujeres que cursan con endometriosis, factor cervico-vaginal, algún grado de factor masculino o infertilidad inexplicable o idiopática (Peña, 2019).

Transferencia de cigotos en estado de pronúcleo (PROST)

La inseminación se realiza *in vitro* considerando este como el día 0 en el que da inicio la cronología del desarrollo embrionario. La inseminación se realiza con la ayuda de una micro pipeta depositando de 10 a 20 μ l. de espermatozoides capacitados en cada una de las cajas de Petri. Las cajas son regresadas a la incubadora y se mantienen bajo vigilancia en espera de la fertilización y el desarrollo posterior. En el día 1, entre 16 y 18 hrs. posteriores a la inseminación, se evalúa la existencia de fertilización la cual se valida como exitosa cuando en la observación microscópica de los óvulos es posible observar la presencia de ambos pronúcleos (Milki et al., 2000) (FIGURA 21).

En este estadio se procede a realizar la transferencia embrionaria, antes de que inicien las divisiones celulares (Milki et al., 2000; Peña, 2019).



FIGURA 21: Estado de Pronúcleos. Puede determinarse una condición diploide por la nítida presencia de ambos pronúcleos al centro. En la periferia se observan los cuerpos polares resultantes de las divisiones meióticas del ovocito.

Adaptado a partir de Three is a crowd with blastocyst transfer (p. 16) por Milki, AA. 2000, Fertil Steril 73 (3)

Transferencia Intratubaria de cigotos (ZIFT)

Es solo una variante de PROST donde la transferencia se realiza una vez verificada la fertilización *in vitro*. Tanto PROST como ZIFT plantean como objetivo proporcionar condiciones de división celular naturales al cigoto que impulsen una correcta implantación. Sin embargo, la evidencia disponible a este respecto es escasa. Son modalidades actualmente infrecuentes en las TRA, aunque sus tasas de embarazo son muy similares. Tanto PROST como ZIFT están indicadas en presencia de factores cervico-vaginales, factor masculino o infertilidad idiopática (González & Serrano, 2010; Milki et al., 2000; Peña, 2019).

Fertilización In Vitro y transferencia embrionaria (FIV&TE)

Esta técnica es por mucho la más utilizada dentro de la moderada complejidad. Fue creada en 1978 y desde entonces se ha perfeccionado de manera constante. A la fecha se calcula que más de cinco millones de niños han nacido bajo esta técnica. Este procedimiento genera mucho conocimiento básico útil en la formación del personal involucrado.

La inseminación se realiza *in vitro* en el día 0 y se verifica la fertilización en el día 1.

Si la fertilización es exitosa, en cada uno de los días subsecuentes, y hasta el momento de la transferencia embrionaria a la madre, es necesario evaluar la calidad del desarrollo embrionario.

Esto se hace en apego a los criterios de la ASEBIR (*Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*) debido a la relación directa que tienen estos parámetros con las tasas de implantación y nacidos vivos (Kably Ambe et al., 2012; Milki et al., 2000; Pons et al., 2014) (FIGURA 22).

En el día 2, de 20 a 24 hrs. después, el embrión comienza a realizar sus primeras divisiones y ya es posible observar de dos a cuatro blastómeras las cuales se dividen hasta un total de seis u ocho en el día 3.

Para el día 4 el embrión pasa al estadio de Mórula con nueve o diez blastómeras que comienzan a compactarse para dar lugar al Blastocelo, la primera cavidad que aparece en el embrión, mientras continúan dividiéndose de tal manera que para los días 5 y 6 el embrión alcanza el estadio de Blastocisto. Si las condiciones morfológicas son óptimas, lo que incluye la distinción del blastocelo, zona pelúcida, masa celular interna (MCI) y trofoectodermo (TE), es posible programar la transferencia embrionaria (Milki et al., 2000).

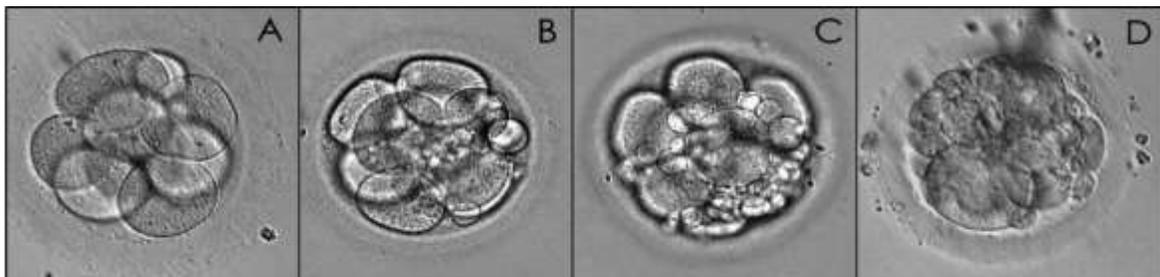


FIGURA 22: Calidad embrionaria según los criterios del ASEBIR. A: embrión de calidad excelente con máxima capacidad de implantación. B: embrión de buena calidad con buena capacidad de implantación. C: embrión de calidad regular con menor capacidad de implantación. D: embrión de mala calidad con baja capacidad de implantación.

Adaptado de Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos (p. 59-60) por ASEBIR 2015, ASEBIR

La transferencia de embriones en estadio de blastocisto tiene la ventaja de transferir embriones mejor seleccionados, favorecer una mayor sincronía entre el embrión y el ambiente uterino y por tanto una menor contractibilidad uterina al momento de la transferencia (Fanchin et al., 2001; Milki et al., 2000). La transferencia en blastocisto también tiene reportadas mayores tasas de embarazo y nacidos vivos que las observadas en estadios previos (Milki et al., 2000; Peña, 2019).

Las tasas de embarazo y nacido vivo con FIV&TE son aproximadamente del 40 al 60% en menores de 35 años, pero se reducen del 27 al 36% de los 35 a los 37 años y del 20 al 26% a los 40 años. Después de esta edad la tasa de éxito baja y se ubica entre el 10 y el 13 % (Bartoov et al., 2002; Berkovitz et al., 2006).

Técnicas de alta complejidad

En un inicio la Fertilización *In Vitro* fue diseñada para mujeres con oviductos dañados irreversiblemente, pero en la actualidad sus alcances se han extendido a prácticamente todas las causas de infertilidad.

Sin embargo, algunos de los factores de infertilidad, sobre todo los masculinos, pueden llegar a grados muy severos donde la calidad espermática tiene índices muy pobres que conlleva a muy malos resultados. Debido a lo anterior, se hizo necesario el desarrollo de técnicas de micro manipulación de gametos con la finalidad de facilitar el acceso del espermatozoide a la zona pelúcida y penetrar el ovocito. Más aún, estas técnicas permiten también trabajar con tan solo algunos espermatozoides. Adicionalmente se han desarrollado técnicas de evaluación para la carga genética de los gametos o del embrión (Peña, 2019).

La HOC guarda similitud a los principios de las técnicas de moderada complejidad y se mantiene el objetivo de recuperación de seis a diez óvulos maduros. En contraste, la muestra de semen requiere procesarse de manera distinta pues dada la severidad en el factor espermático de estos casos es necesario asegurar una recuperación celular mínima.

La separación espermática se realiza mediante medios de diferentes densidades que forman en el tubo de ensayo gradientes de distintas concentraciones a través de los cuales los espermatozoides son centrifugados durante 15 a 20 minutos a 300g.

La distinta densidad de los gradientes forma interfases en las cuales van separándose los espermatozoides en función de su tamaño, y en consecuencia de su morfología. Incluso en muestras de baja densidad espermática es posible obtener una óptima recuperación celular con la cual se pueden realizar estas técnicas (Peña, 2019).

Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI)

Esta técnica está indicada en grados muy severos de factor masculino como oligozoospermia y teratozoospermia severas e incluso en casos de azoospermia por retención espermática epididimal o azoospermia por obstrucción post-infecciosa, post-quirúrgica, post-traumática o post-vasectomía. Parejas para quienes su única opción era la inseminación por donador, ahora tienen excelentes posibilidades de lograr un embarazo con esta alternativa.

Un laboratorio de gametos competente para ICSI necesita contar con un micromanipulador con placas de calefacción, equipo de videograbación y una mesa anti vibración. La ICSI requiere de la denudación de las células de la granulosa del ovocito con el fin de lograr una inyección más precisa, además de que es posible hacer una evaluación más certera de la madurez ovular.

Una vez denudados los ovocitos se determina normalidad, madurez y calidad y se incuban por 20 minutos. Los espermatozoides se suspenden en Polivinilpirrolidona (PVP) al 10% que por su alta viscosidad limita la movilidad del espermatozoide facilitando la aspiración con la micropipeta (Peña, 2019).

La inmovilización espermática es crucial porque desestabiliza la membrana plasmática y favorece la liberación del factor citosólico del espermatozoide indispensable para la activación ovular, la descondensación del núcleo espermático y la formación del pronúcleo masculino (Devroey & Van Steirteghem, 2004).

La aspiración se hace por la cola del espermatozoide con una micropipeta de inyección que contiene PVP. El óvulo se sujeta con una pipeta de sujeción verificando que el cuerpo polar quede ubicado en la posición 6 o 12 del reloj para evitar dañarlo.

La inyección se hace en placas que contienen gotas de PVP cubiertas de aceite mineral en las cuales son colocados óvulos y espermatozoides. La aguja microinyectora se ubica en la zona ecuatorial del ovocito que correspondería a las 3 del reloj y en esta posición se realiza la punción de la zona pelúcida y la membrana plasmática. Se aspira una mínima cantidad de citoplasma solo para verificar la penetración exitosa y se libera al espermatozoide junto con el citoplasma aspirado. Se retira suavemente la microaguja y se observa la restauración de la membrana plasmática (Peña, 2019) (FIGURA 23).

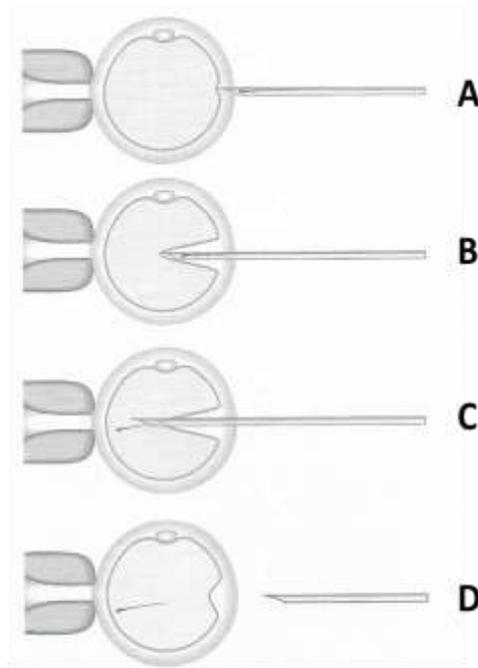


FIGURA 23: Técnica de la ICSI. A. Fijación del ovocito con la pipeta de sujeción. B. Introducción de la microaguja. C. Inyección del espermatozoide en el citoplasma ovular. D. Ovocito inyectado
Adaptado de Atención integral de la infertilidad 3ª ed. (p. 531) por Pérez Peña, E. 2019, Panamericana

El ovocito se libera y se regresa a condiciones de cultivo donde permanecerá mientras se sigue el protocolo antes descrito de verificación de fertilización, vigilancia y valoración de calidad. Si la fertilización y, por ende, las divisiones celulares son exitosas, se procede a la transferencia embrionaria.

Los resultados que ofrece la ICSI son ligeramente mejores a los que ofrece la FIV&TE con la diferencia de ser una técnica más costosa por el uso de la tecnología que requiere. La ventaja real de este procedimiento es que ofrece buenos resultados donde la FIV fracasa y en casos de factor masculino severo (Peña, 2019).

Inyección intracitoplásmica de espermatozoides seleccionados morfológicamente (IMSSI)

La realización de la IMSSI requiere de una técnica complementaria denominada MSOME (*Motile Sperm Organellar Morphology Examination*) con la cual es posible identificar en los espermatozoides características no visibles en microscopios convencionales. El objeto de mayor interés es el núcleo espermático el cual debe ser oval, simétrico y de bordes lisos con cromatina nuclear homogénea y sin más de una vacuola que no debe ocupar más del 4% del área nuclear (Bartoov et al., 2002).

Bajo estos criterios se hace la selección morfológica del mejor espermatozoide y se sigue la metodología de ICSI. Estudios recientes indican que las tasas de embarazo y de implantación son mejores con IMSSI que con ICSI llevándolas de 30 a 66% (Antinori et al., 2008; Berkovitz et al., 2006; Vanderzwalmen et al., 2008).

HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA CONTROLADA (HOC)

Como es evidente, los gametos tanto masculino como femenino, constituyen la base de éxito de las TRA y no solo por su necesaria disponibilidad sino también por su calidad y viabilidad. Sin embargo, mientras el semen se obtiene en la gran mayoría de los casos de acuerdo a su producción natural, los óvulos deben ser obtenidos en mayor cantidad pues cada ovulo recuperado es en sí mismo una oportunidad de éxito.

La HOC es la metodología para obtener más de un óvulo maduro por ciclo y que técnicamente consiste en la manipulación endocrina del ovario de forma exógena y controlada y que busca súper producir óvulos viables con la capacidad de ser fecundados (Peña, 2019).

La HOC debe su nombre a la utilización de dosis hormonales incrementadas con respecto a un ciclo ovárico natural aplicadas en días y dosis específicas. La HOC es en realidad una imitación controlada del ciclo ovárico natural a mayor escala.

La HOC tuvo sus inicios en la década de los 70's, pero al no ser metodologías plenamente establecidas existían demasiados fracasos en la tasa de embarazos. Posteriormente los óvulos se obtenían de ovarios no estimulados y de esta manera se logró obtener un primer nacimiento en 1978 (Edwards et al., 1980).

Sin embargo, los embarazos continuaban siendo muy pobres por lo que se decidió retomar la estimulación exógena estableciendo protocolos bien definidos susceptibles en todo momento de control. La HOC se aplica en mujeres ovulatorias y anovulatorias con la intención de obtener entre dos y tres óvulos para procedimientos de baja complejidad y de seis a diez en procedimientos de moderada y alta complejidad (Peña, 2019).

El objetivo de la HOC no solo procura un mayor número de óvulos sino también su madurez y calidad además de fomentar un endometrio receptivo. Cada protocolo de estimulación ovárica se individualiza para obtener la mejor respuesta ovárica posible y evitar al máximo el *Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO)* y los embarazos múltiples. El SHO es la principal y más temida complicación de la HOC.

Se trata de una complicación endocrina en la que ciertas sustancias vasoactivas incrementan la permeabilidad vascular con la consecuente filtración de un fluido rico en proteínas del líquido intravascular al espacio extravascular ocasionando hemoconcentración e hipovolemia y con ello desequilibrio hidroelectrolítico. La gravedad del cuadro radica en que si la mujer no recibe atención pronta y adecuada se presenta acumulación hídrica abdominal, denominada *Ascitis*.

Esta complicación puede progresar hacia el tórax denominándose por ello *Hidrotórax* que potencialmente puede complicarse con alteraciones en la coagulación, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, respiratoria e incluso falla orgánica múltiple.

Es una complicación de alta morbilidad y potencialmente mortal considerada en las TRA como iatrogénica (*daño indeseado en la salud del individuo, causado o provocado, como efecto secundario inevitable, por un acto médico legítimo y avalado*) (García Garduza, 2015; González & Serrano, 2010).

En la actualidad, además de las hormonas utilizadas, hay otros fármacos a los que también se recurre para manipular de forma más precisa el ciclo ovárico. Las dosis que se utilizan son las mínimas que permiten obtener resultados efectivos (González & Serrano, 2010; Peña, 2019).

Esto ha generado una amplia versatilidad de esquemas de estimulación existiendo prácticamente uno que se apega a cada necesidad según la causa de infertilidad y la técnica seleccionada para tratarla. Los esquemas de estimulación se conocen técnicamente como *Protocolos de Estimulación Ovárica* y pueden ser fijos o flexibles, con preparaciones de depósito o de aplicación diaria, cortos o largos y en ellos se pueden utilizar las siguientes opciones farmacológicas:

Agonistas de la GnRH

Los agonistas de la GnRH son fármacos isómeros de la GnRH hipotalámica cuya estructura química presenta modificaciones puntuales en ciertos aminoácidos que le confieren distintas propiedades. Una de estas propiedades es un mayor tiempo de unión al receptor específico lo que genera una estimulación más intensa sobre dicho receptor.

El resultado es una mayor secreción endocrina de GnRH con respecto a la secreción fisiológica normal tras cada pulso. Esta cantidad más elevada de GnRH en sangre induce en consecuencia una mayor secreción de FSH y LH por parte de la hipófisis. El incremento es hasta un 34% mayor con respecto a la secreción normal.

Al generarse cantidades tan elevadas de FSH y LH en sangre se induce una RN más intensa en un intento por regular estas altas concentraciones, regulación que es lograda con la supresión del funcionamiento de los gonadotrópos hipofisarios. A este evento se le denomina supresión hipofisaria. La supresión que se alcanza es casi total 14 días posteriores al inicio del tratamiento cuando FSH y LH decaen por completo.

A esta serie de eventos sucesivos, de incremento, regulación y supresión, se les conoce en conjunto como *efecto flare up* o *llamarada* en alusión a la sensación quemante que por la elevación de la testosterona experimentaban los hombres tratados con estos fármacos que inicialmente se indicaron en el cáncer de próstata (Lepor, 2005).

La supresión gonadotrópica deja al eje hipotálamo-hipófisis libre para ser manipulado exógenamente con dosis específicas de cada hormona por periodos específicos de tiempo. Una de las ventajas más importantes de la supresión es que se logran evitar picos prematuros de LH responsables de luteinización prematura, falla en el soporte lúteo y la cancelación de hasta el 30% de los ciclos.

Existe evidencia que indica que la supresión gonadotrópica ha permitido el incremento al doble de las tasas de embarazo debido quizá a un control hormonal más preciso (Hughes et al., 1992).

Antagonistas de la GnRH

Los antagonistas de la GnRH son una nueva clase terapéutica de isómeros de la GnRH cuya característica distintiva es el cambio de ciertos aminoácidos en posiciones muy específicas de la molécula nativa lo cual le confiere a la nueva molécula propiedades farmacodinámicas únicas (FIGURA 24).

Entre tales propiedades la más destacable, y que es parte medular en su mecanismo de acción, es la capacidad de los antagonistas para interactuar con su receptor sin generar respuesta biológica alguna. La unión de un antagonista con el receptor a GnRH se hace por competencia con la GnRH endógena.

Otras propiedades de los antagonistas incluyen mayor tiempo de unión al receptor así como mayor afinidad por el mismo (Crawford et al., 2011, 2018).

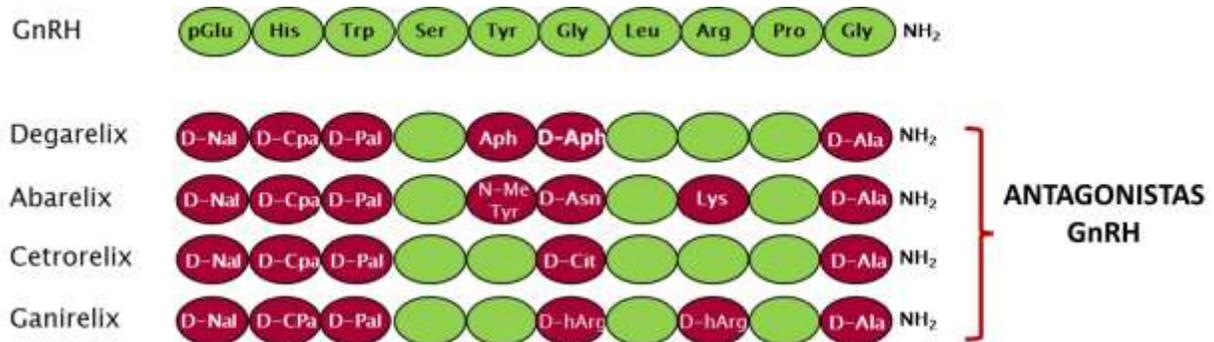


FIGURA 24: Secuencia de aminoácidos comparada entre los antagonistas de la GnRH y la GnRH humana
Adaptado de A phase III extension trial with a 1-arm crossover from leuprolide to degarelix (p. 891) por Crawford D. et.al. 2011; J Urol 186 (3)

Debido a la interacción inerte de los antagonistas sobre el receptor a GnRH, el efecto *flare up* descrito anteriormente con los agonistas no se expresa, es decir, estos fármacos no ejercen incrementos hormonales. Su función es lograda por el bloqueo posicional sobre el receptor impidiendo que el estímulo de la GnRH endógena se ejerza. El resultado es una supresión hipofisaria inmediata, desde el comienzo de la administración del fármaco, lo que lleva a la disminución de la FSH y LH endógenas casi a niveles nulos. Esta es la razón por la que las gonadotropinas deben ser agregadas simultáneamente al antagonista al iniciar el protocolo de estimulación (Cirne et al., 2021; Crawford et al., 2018).

La rápida supresión hipofisaria permite que los protocolos sean más breves con una dosificación más baja pues, al no generarse una supresión tan prolongada como en el caso de los agonistas, se necesitan menores dosis de FSH y la recuperación de la LH endógena es más rápida lo cual probablemente altere en menor medida la fase lútea (Kably Ambe et al., 2012; Peña, 2019).

Gonadotropinas hipofisarias (FSH/LH)

Las gonadotropinas FSH y LH son fundamentales en la HOC pues son el sustento del desarrollo folicular y la maduración ovular y han sido una parte crítica en la evolución de los protocolos de estimulación.

Inicialmente las gonadotropinas fueron obtenidas a partir de muestras de orina pues estaba demostrado el aclaramiento sérico de las hormonas por vía renal, pero poco después se optó por la orina posmenopáusica humana como una fuente más conveniente. Debido a este origen las FSH/LH obtenidas se denominan en conjunto *Menotropinas (HMG Human Menopausal Gonadotropins)*.

Las menotropinas fueron preparaciones hormonales indispensables en los inicios de la HOC. Sin embargo, uno de sus aspectos débiles es que presentaban una relación FSH/LH fija lo que dificultaba estructurar protocolos de estimulación individualizados de acuerdo a necesidades específicas. La variabilidad en la consistencia de un lote a otro fue también un problema común aunado a la existencia de impurezas, pero la creciente expansión de la reproducción asistida a nivel mundial, y en consecuencia el incremento en la demanda de estas preparaciones hormonales, condujo al perfeccionamiento de las técnicas de aislamiento y purificación aprovechando el surgimiento de nuevas técnicas inmunológicas basadas en el uso de anticuerpos poli y monoclonales que permitieron obtener preparaciones altamente purificadas (Smitz et al., 2016).

Gracias a estos avances es que hoy en día las menotropinas se mantienen vigentes como opciones viables dentro de los protocolos de estimulación (González & Serrano, 2010). El posterior surgimiento de la tecnología recombinante permitió dejar la dependencia urinaria, y ofreció preparaciones con actividad hormonal altamente específica y con contaminación mínima.

La tecnología recombinante fue sin duda un hito en la ciencia reproductiva por las múltiples ventajas ofrecidas sobre aquellas de origen urinario como pureza, seguridad, resultados consistentes, mayor bioactividad y capacidad de producción ilimitada con excelentes estándares de calidad.

Los protocolos de estimulación pueden ser individualizados óptimamente pues la tecnología recombinante ha permitido generar preparaciones aisladas de LH que se agregan separadamente a la FSH y que genéricamente se denominan como *rLH* o *rFSH* (*recombinant LH/FSH*).

Es innegable que el origen recombinante llevo a una clara mejoría en las tasas de embarazo, pero se introdujo también un incremento en la presentación del SHO. De forma general, las diferentes clínicas de reproducción asistida internacionales reportan una incidencia de este síndrome de entre el 1 y el 10% (Aboulghar & Mansour, 2003).

En México las cifras de incidencia del SHO suelen ser poco consistentes porque al ser una métrica negativa en la práctica de las clínicas existe reticencia a compartir la casuística real, o bien, existe un subregistro de la incidencia real. Las instituciones públicas, por su parte, al tener mínimas unidades a nivel nacional que brinden esta atención ofrecen una muestra poblacional poco representativa por lo que tampoco es concluyente.

La incidencia del SHO es una de las más importantes áreas de mejora que tienen en la actualidad las TRA.

Gonadotropina coriónica humana / Coriogonadotropina (hCG)

La hCG es una compleja hormona glicoproteica compuesta por 2 cadenas de proteínas, denominadas cadena α y β , que se unen por enlaces no covalentes y que forma parte del grupo de las llamadas hormonas glicoproteicas donde están incluidas la FSH, LH y la TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*). Se sintetiza principalmente por tejidos embrionarios, específicamente por el tejido trofoblástico, pero también por las vellosidades coriales de la placenta por lo que durante el embarazo su secreción se incrementa en relación al crecimiento placentario (Sadler & Langman, 2016).

En contraste con las cadenas α de las hormonas glicoproteicas, las cuales tienen estructuras idénticas de 92 aminoácidos, las cadenas β de todas ellas difieren en su estructura proteica siendo esta la razón de sus diferentes propiedades biológicas.

Sin embargo, la cadena β de la hCG y de la LH son estructuralmente similares mostrando en sus 121 aminoácidos un 80 % de homología que en la hCG se complementa con una extensión de 24 aminoácidos en el carbono terminal que no posee la cadena β de la LH (Ulloa-Aguirre et al., 1992; Ulloa-Aguirre, Timossi, et al., 2001).

Tal grado de similitud permite que la vía de acción de la hCG sea a través del receptor para LH y que tenga una actividad muy similar a esta en el cuerpo lúteo, el trofoblasto y en los tejidos uterinos (Cole, 2012).

En algunas mujeres, tras la supresión del eje hipotálamo-hipofisario con agonistas o antagonistas, puede registrarse ausencia o picos inadecuados de LH que culminan en una falla ovulatoria o en una fase lútea corta. En otros casos los picos de LH se tornan prematuros y también están demostradas alteraciones hormonales que tienden a la hipersecreción de LH. Por todo lo anterior, confiar en la participación de la LH endógena en la estimulación ovárica puede ser un error no permisible.

Esta es la razón por la cual la hCG puede usarse conjuntamente a la FSH para inducir actividad LH en HOC representando una excelente alternativa en casos de secreciones irregulares de LH. Además, está demostrado que este esquema de estimulación ovárica permite un desarrollo folicular más sincrónico con el consecuente incremento en la calidad ovular (González & Serrano, 2010).

Su utilidad también es evidente en supresión acentuada de LH y por supuesto en la rotura folicular previa a la ovulación (Cole, 2012; Kably Ambe et al., 2012; Peña, 2019).

RETOS ACTUALES EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Aunque la infertilidad no es causa de ninguna molestia física ni es una condición que ponga en peligro la vida de quien la padece, si es un problema muy serio para aquellos individuos o parejas que sienten un deseo legítimo por engendrar. Es una situación que puede incluso comprometer metas de vida, causar un notable estrés emocional, frustración personal y que puede conducir a rupturas familiares (Esparza-Pérez, 2017).

Lejos de lo que la sobre población mundial pudiera sugerir, la reproducción humana es una facultad compleja, que está sujeta a numerosos e intrincados mecanismos que deben funcionar sincrónicamente para dar lugar a un nuevo ser.

El estudio y comprensión de la biología reproductiva abrió un nuevo campo del conocimiento con avances vertiginosos durante los últimos 30 años que representan soluciones factibles para quienes sufren infertilidad y anhelan una opción correctiva.

El entendimiento de la fisiología ovárica y el consecuente desarrollo de la HOC permitió que hoy en día la reproducción asistida haya logrado embarazos y nacidos vivos para estas parejas, pero estos logros han traído aparejadas otras dificultades que representan los retos actuales en esta área (Esparza-Pérez, 2017; González-Santos, 2020; López-Ortiz, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el SHO es la complicación más temida por sus efectos potencialmente mortales, así como la generación de embarazos múltiples, no solo por los riesgos fisiológicos para la madre y los fetos, sino también por el reto económico que significa para los padres.

El destino de los óvulos o embriones que puedan llegar a ser excedentes no está claro ni obligado pues no existe una legislación que regule efectivamente estas prácticas y condicione a decisión alguna.

Algunos centros optan por la vitrificación (técnica de congelación ultrarrápida que mantiene inalterados los óvulos hasta su utilización) o la congelación para mantenerlos en un banco de óvulos hasta su posterior uso por la mujer productora o por una mujer distinta cediéndolos a programas de donación. Otros centros los destinan a investigación cuando la mujer productora renuncia a sus derechos sobre ellos. En otros casos los óvulos simplemente son abandonados (Peña, 2019).

Es por todo lo anterior que una de las necesidades más apremiantes en reproducción asistida es lograr una estimulación ovárica aún más precisa dentro de un rango de respuesta predecible y con mínimos riesgos secundarios.

Si bien es reconocido que ambas gonadotropinas, FSH y LH, son necesarias en la maduración folicular, es mayor la relevancia de la FSH por el papel decisivo que juega en la dominancia folicular y por ende en la producción ovular, eventos que requieren altas cantidades de FSH. Está demostrado que la LH se requiere en cantidades muy bajas que existen incluso bajo supresión farmacológica de la hipófisis.

Por ello, la pieza clave en una estimulación óptima lo es indudablemente la FSH y a ello obedece la generación de una continua investigación que busca perfeccionar las preparaciones comerciales de FSH.

Existen varios objetivos que deben observarse en aras de crear protocolos más precisos enfocados a la obtención de un número de óvulos más predecible y manejable con individualización de las dosis en base a parámetros individuales (Esparza-Pérez, 2017; Kably Ambe et al., 2012; López-Ortiz, 2014):

- ❖ Refinamiento en la obtención de preparaciones de FSH orientadas a un mayor apego a la fisiología humana
- ❖ Condiciones de producción basadas en líneas celulares humanas
- ❖ Menor variación lote a lote y mínima contaminación proteíca
- ❖ Mayor efectividad a menores dosis minimizando el riesgo de SHO

LA FSH Y SU MANEJO EXOGENO

Hacia el final de la década de los años 50 y principios de los 60's tuvieron inicio los primeros intentos para aislar y purificar la FSH humana (hFSH) a partir de extractos pituitarios y/o muestras de orina utilizando enzimas digestivas y algunas técnicas de electroforesis y cromatografía. Sin embargo, estas técnicas eran muy costosas y aun no permitían obtener preparaciones hormonales suficientemente purificadas (Donini et al., 1966; Lunenfeld, 2004).

El desarrollo de nuevas técnicas inmunológicas basadas en el uso de anticuerpos para lograr el aislamiento de una proteína específica permitió obtener preparaciones hormonales más purificadas tomando como fuente la orina de mujeres posmenopáusicas. Este tipo de orina se obtiene por donación internacional de mujeres menopaúsicas o posmenopáusicas entre los 40 y 45 años de edad. Se prefiere orina de esta etapa debido a que la reducción en los niveles séricos del estradiol, y la pérdida del *feed-back negativo* relacionado a la transición menopáusica, permiten una mayor acumulación sérica de FSH que además predomina en isoformas ácidas. Las razones biológicas para este predominio son completamente desconocidas, pero se ha postulado que quizá se trate de un intento de la unidad hipotálamo-hipófisis por re-estimular a un ovario hipo responsivo (Anobile et al., 1998; Thomas et al., 2009).

En 1966 el trabajo de Donini y colaboradores describe el uso de cromatografía de intercambio iónico sobre una muestra de menotropinas humanas para separar LH anclada a anticuerpos hCG de las fracciones de FSH obteniendo una preparación purificada de FSH con baja actividad LH.

El posterior refinamiento de estas técnicas de purificación inmunológica asociadas a cromatografía incluyó el uso de anticuerpos policlonales murinos con afinidad a LH como método para su remoción en muestras de orina posmenopáusica obteniendo una preparación de FSH altamente purificada con actividad LH casi despreciable (Donini et al., 1966; Goa & Wagstaff, 1998).

Estas preparaciones surgieron al inicio de la década de los 80's y se empezaron a comercializar como la primera preparación de FSH urinaria purificada para uso clínico y que por tanto sería categorizada como *FSH Urinaria* o *Urofolitropina*; *uFSH* (*urinary FSH*) (FIGURA 25).

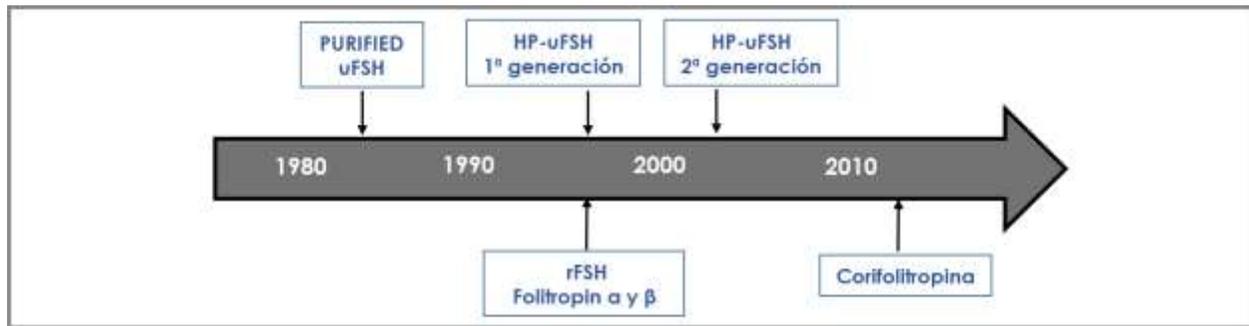


FIGURA 25: Cronología en la síntesis de la FSH.
 Adaptado de *Follicle-stimulating hormone: A review of form and function in the treatment of infertility* (p. 4) por Smitz, J. 2015, *Reprod Sci* 1 (11)

Desafortunadamente, la actividad FSH obtenida en el producto final mostraba constante variabilidad entre lotes debido en gran medida al origen enormemente heterogéneo de las fracciones FSH. A esto se sumó una novedosa preocupación por una factible contaminación por priones (Donini et al., 1966; Lunenfeld, 2004; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama, 2008).

Al inicio de la década de los 90's, y con mayores avances en inmunología, los métodos de purificación hormonal migran al uso de anticuerpos monoclonales específicos para FSH con la cromatografía como método de separación. La FSH aislada de esta manera mostro una actividad altamente específica, con muy baja actividad LH y con mínima contaminación proteica. Las preparaciones obtenidas con esta modalidad se categorizaron como *FSH Urinarias Altamente Purificadas*; *HP-uFSH* (*Highly Purified-urinary FSH*) y dieron lugar a una nueva comercialización (Goa & Wagstaff, 1998; Leao & Esteves, 2014).

En esta misma década la tecnología recombinante surgida años atrás, y denominada *ADN recombinante* por su naturaleza, basada en la combinación de fragmentos específicos de ADN que después son colocados en un determinado vector para su expresión en una célula huésped, une sus avances al hallazgo reciente de la identificación de los genes que codifican las cadenas α y β de esta hormona dando origen a preparaciones aun de mayor especificidad y pureza la cual es alcanzada al pasar el producto final por seis fases de ultrafiltración y cromatografía por inmunoadfinidad con el uso de anticuerpos monoclonales y algunas fases finales de filtración adicional para la remoción de proteínas animales remanentes (Smitz et al., 2016).

El producto terminal es una FSH recombinante de muy alta pureza y actividad FSH altamente específica con actividad LH \leq 2% (Shoham & Insler, 1998; Smitz et al., 2016).

Estos productos se categorizaron como *FSH recombinantes Altamente Purificadas; HP-rFSH (Highly Purified-recombinant FSH)*. Las células huésped usadas en la producción de estas hormonas son células eucariontes animales no humanas que específicamente derivan del ovario del hámster chino, *Cricetulus barabensis*, y que se denominan como células CHO.

En el mercado internacional actual existen dos tipos de preparaciones de FSH recombinante que se conocen genéricamente como *Folitropina α* y *Folitropina β* . La nomenclatura de estos productos no tiene nada que ver con las subunidades α y β de la molécula de FSH y se refiere simplemente al orden cronológico de comercialización. Ambas se producen en células CHO.

En el 2010 las opciones de FSH recombinantes se ampliaron cuando concluyó la investigación y desarrollo de una nueva preparación de FSH producida con tecnología recombinante que fusiona a las cadenas α de la FSH cadenas β de hCG formando una molécula híbrida y que se denominó como *Corifolitropina Alfa (FIGURA 23)*. Esta molécula muestra alta especificidad por el receptor, pero a diferencia del resto de rFSH, exhibe mayor estabilidad y potencia lo que se traduce en una mayor vida media plasmática.

Esta vida media mejorada permite sustituir las aplicaciones de los primeros siete días en los protocolos de estimulación por una sola aplicación (Howles, 1996; Shoham & Insler, 1998).

Las rFSH están dominando cada vez más en los protocolos de estimulación ovárica. No obstante, las preparaciones de origen urinario aún prevalecen en el mercado gracias a metodologías de purificación más refinadas que les dan un mayor grado de pureza que los obtenidos años atrás, pero aún persiste la preocupación por factible contaminación y las variaciones de la actividad biológica entre lotes.

DIFERENCIAS BIOLÓGICAS ENTRE FSH URINARIA Y RECOMBINANTE

Aun cuando el origen de las formulaciones de FSH puede ser diferente, ya sea de orina posmenopáusica o de tecnología recombinante, la estructura proteica de ambos tipos de moléculas es idéntica. Sin embargo, es posible encontrar diferencias en lo que respecta a los procesos de glicosilación y sialilación de las moléculas finales (Shoham & Insler, 1998; Wely et al., 2011).

Las preparaciones derivadas de orina posmenopáusica se obtienen a partir de una FSH producida naturalmente por la hipófisis, que es aislada y purificada de la orina, por lo que conservan los patrones de glicosilación de un perfil humano, aunque muestran un predominio de las isoformas ácidas.

Este predominio de isoformas ácidas de FSH se debe a que todas las isoformas producidas en la hipófisis entran a la circulación general antes de ser excretadas en la orina por lo que las isoformas de vida media más corta, las isoformas básicas, son metabolizadas de forma previa al aislamiento y purificación a partir de la orina. Esto, aunado a la reducción de los niveles séricos de estrógenos durante la menopausia, conduce a una mayor acumulación de isoformas más sializadas y con vida media más larga durante esta etapa. Todo esto explica la preponderancia de isoformas ácidas en la uFSH (Howles, 1996; Smitz et al., 2016).

En contraste, la FSH producida por tecnología recombinante puede presentar variaciones en sus patrones de glicosilación y sialilación con respecto a la FSH humana debido a que las células CHO, tipo celular predeterminado en la producción de hormonas recombinantes, muestran patrones de glicosilación distintos en su aparato de Golgi con respecto a los patrones que se expresan por los gonadotrópos humanos. Estas diferencias en los patrones transcripcionales conlleva a que el equilibrio de las diferentes isoformas de FSH en el producto final también pueda ser distinto (Wely et al., 2011).

La síntesis proteica en una célula CHO incluye *ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc)* como residuo siálico y *galactosa alfa 1-3 galactosa glicano* como uno de los oligosacáridos agregados en la glicosilación los cuales no se encuentran en la síntesis humana y están asociadas con reacciones inmunológicas que incluyen anafilaxia, hipersensibilidad o inflamación, esta última como una respuesta de inmunidad inespecífica ligada a algunas otras enfermedades.

Adicionalmente, las células CHO carecen de la *alfa 2-6 sialyltransferasa*, enzima necesaria en los patrones de glicosilación humana. Esto tiene una importancia muy relevante para la función de las gonadotropinas porque las cadenas de oligosacáridos agregados en sus estructuras durante la glicosilación pueden tener un impacto sustancial en diversos aspectos de su actividad biológica incluido el anclaje a receptores, señales de transducción o en su estabilidad molecular (Smitz et al., 2016).

En forma comparativa, la administración de HP-uFSH, en la cual existe actividad conjunta de FSH y LH, es posible observar niveles séricos de FSH altamente consistentes hasta el día 6 del protocolo de estimulación, mientras que con la administración de rFSH son más variables lo cual parece sugerir que las isoformas urinarias son más estables y de una vida media más larga (Bosch et al., 2008; Frydman et al., 2000; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama, 2008).

En contraste con las isoformas ácidas de vida media larga, las isoformas básicas tienen una vida media corta.

Diversos resultados experimentales (incremento *in vitro* de la producción estrogénica y/o incremento en la actividad del activador tisular del plasminogeno) sugieren que también poseen una mayor potencia biológica sobre su receptor (Anobile et al., 1998; Smitz et al., 2016).

Todos estos hechos permiten fácilmente entender que no existe una clara inclinación hacia el uso preferente de un tipo u otro de FSH, de hecho, diversos trabajos han concluido que el balance de la eficacia entre gonadotropinas urinarias y recombinantes es muy similar, aunque están aceptadas las diferencias en los patrones de glicosilación con un posible impacto en sus actividades biológicas (Frías Iniesta, 2008; Goa & Wagstaff, 1998; Hedon et al., 1995; Smitz et al., 2016; Wely et al., 2011).

Sin embargo, existe un aspecto que aun genera controversia y que ha sido decisivo para el creciente dominio del uso clínico de las hormonas recombinantes y es la seguridad de las preparaciones.

En los años 80's se dio a conocer de forma mundial el brote de la enfermedad de *Creutzfeldt-Jakob (ECJ)* como una enfermedad neurológica asociada a ciertas moléculas de proteínas como factores causales denominadas *Priones (PrP)*. La comunidad científica internacional comenzó a adoptar medidas precautorias en relación a este hallazgo por el temor de que existiese transmisión de PrP a través de la orina y fue la verdadera razón de fondo que obligo a la mejora en los métodos de purificación de las menotropinas, más aún cuando la *Encefalitis Espongiforme Bovina*, surgida en esta misma década en el Reino Unido, demostró que podía ser una variable que podía afectar al humano (Frías Iniesta, 2008).

Aunque no existen datos concluyentes que permitan asegurar la posibilidad de contagio de estas partículas a través de la orina, la inquietud ha permanecido y comenzó a ser una limitante para su uso clínico.

Aunado a ello, la creciente demanda por la asistencia reproductiva condujo en su momento a una demanda también creciente de las preparaciones hormonales urinarias y por lo tanto la necesidad de donantes urinarias también se incrementó.

En un inicio la demanda mundial de gonadotropinas urinarias se lograba abastecer con la obtención de 120,000 lts. de orina donados por entre 600 y 1000 mujeres. Posteriormente, el incremento en la demanda requirió la donación de 600,000 mujeres a principios de este siglo (Howles, 1996).

Esto necesito de la incorporación de más países como China, Corea, Argentina o la India a las estrategias de recolección internacional por lo que generar una trazabilidad en la obtención de las muestras que garantizara su seguridad fue cada vez más complejo (Frías Iniesta, 2008). Debido a estas dificultades cada año existen marcadas variaciones en las cantidades de menotropinas disponibles en el mercado mundial, México incluido.

La evolución histórica en el desarrollo de las gonadotropinas ha permitido avanzar en varios aspectos relevantes tales como el incremento significativo en la pureza de las preparaciones, en su actividad específica y en la homogeneidad de los lotes, así como en la reducción del contenido de proteínas contaminantes, en el riesgo de transmisión de infecciones y en la frecuencia de eventos adversos (Shavit et al., 2016).

En conclusión, aspectos tales como la seguridad de las preparaciones, la mínima variación lote a lote, el grado de pureza, la producción de preparaciones individualizadas de FSH y LH y la disponibilidad garantizada en el mercado gracias a procesos de producción estandarizados y validados internacionalmente, hacen que el uso de la rFSH mantenga un marcado predominio en los protocolos de estimulación y que las líneas de investigación a futuro tengan un enfoque muy dirigido sobre la tecnología recombinante con el objetivo central de mejorar las dosificaciones, la seguridad y la tasa de embarazos.

GENERALIDADES DEL ADN RECOMBINANTE

El descubrimiento de la estructura del ADN por James Watson y Francis Crick en la Universidad de Cambridge, Inglaterra, en 1953 fue sin duda el estímulo que requería la investigación molecular para iniciar el desarrollo de técnicas en ingeniería genética que para 1966 permitieron conocer un código genético completo.

Hacia el final de los 60's dos descubrimientos más serian piedras angulares para las técnicas de manipulación genética: el descubrimiento de una enzima llamada *ADN ligasa*, que permite unir dos fragmentos separados de ADN, y otra enzima de escisión, denominada *enzima o endonucleasa de restricción*, que permite cortar una secuencia precisa de ADN. Estas herramientas permitirían unir dos secuencias específicas de ADN que normalmente no se encuentran juntas, p.e. en organismos diferentes, dando origen al concepto de *ADN recombinante* (Howles, 1996; Shoham & Insler, 1998).

Cuando una molécula de ADN recombinante es introducida en un organismo se produce una modificación genética en su genoma debido a la adición de una nueva secuencia de genes. Esto condiciona la expresión de nuevos factores biológicos, los que codifica la nueva secuencia. Las proteínas nuevas que ahora son expresadas a partir del ADN recombinante reciben la denominación de *proteínas recombinantes* (Garrido Pertierra et al., 2009).

Gracias al uso de las técnicas del ADN recombinante y de ingeniería genética se ha expandido el entendimiento de la estructura, organización y expresión de los genes y se han posibilitado amplias aplicaciones en la actividad humana a muy diversos niveles.

En el campo de la medicina, la tecnología del ADN recombinante, ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico y detección para varias enfermedades genéticas como la hemofilia, así como el desarrollo de terapias producidas a escala industrial para el manejo de enfermedades metabólicas como la hipercolesterolemia, la osteoporosis o la diabetes.

El arroz dorado, que biosintetiza caroteno, así como los cultivos resistentes a herbicidas o insectos, son también producto del ADN recombinante.

TECNOLOGIA EN LA OBTENCION DEL ADN RECOMBINANTE

El ADN recombinante es producto de diferentes técnicas que son necesarias para la manipulación del material genético.

El proceso para obtener una molécula recombinante puede dividirse de forma muy general en cuatro pasos principales: aislamiento, recombinación, transformación o transfección y clonación/amplificación (Howles, 1996) (FIGURA 26).

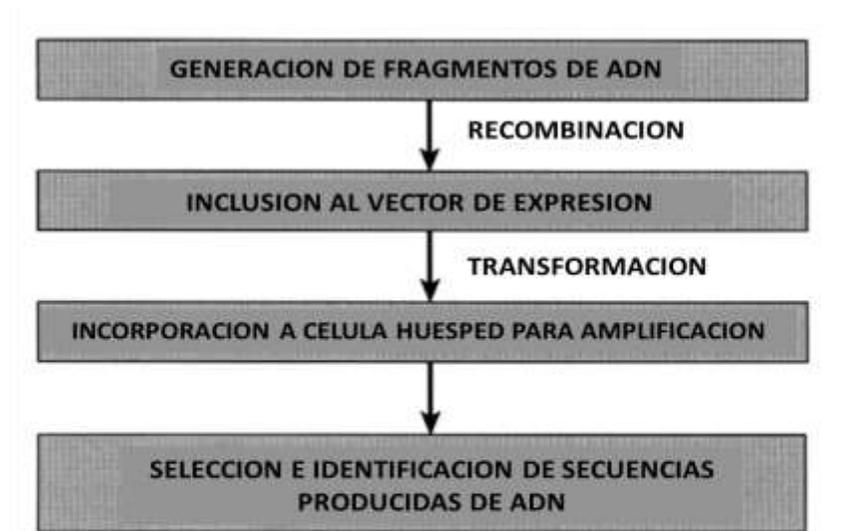


FIGURA 26: Ingeniería genética de la recombinación
Adaptado de Genetic engineering of human FSH (p. 179) por Howles, C.M. 1996, Hum Reprod 2 (2)

Aislamiento del ADN

La generación de una proteína recombinante requiere de forma inicial y mandatoria la identificación del gen que la codifica en el ADN nativo. Una vez que es identificado y secuenciado el ADN se purifica de otros componentes celulares como proteínas, lípidos o carbohidratos y se somete a fragmentación mediante enzimas de restricción para aislar los fragmentos que contienen el gen buscado. Las enzimas de restricción son proteínas comunes en las bacterias que cumplen con una función de defensa al destruir el ADN de los bacteriófagos que pueden invadirlas (Howles, 1996).

Son enzimas con la capacidad de reconocer y romper la doble cadena del ADN en sitios específicos que presentan simetría inversa entre sí en una longitud determinada, lo cual se denomina *Secuencia Palindrómica*. Los cortes que estas enzimas ejercen son de dos tipos: uno que corta ambas cadenas de forma escalonada dejando extremos "adhesivos" o "cohesivos" y otro que corta de forma lineal en un mismo punto dejando extremos romos (Garrido Pertierra et al., 2009) (FIGURA 27).

Los fragmentos resultantes de ADN se separan usualmente por electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa. La identificación de la banda de ADN que contiene el gen de interés se suele realizar por *Hibridación*, una técnica que también es aplicable para separar moléculas de ARN y proteínas. El paso siguiente es obtener el gen funcional que codifica la proteína buscada (Mulligan, 1993).

El método para aislar a este gen funcional consiste en utilizar el *ARN mensajero (mARN)* que expresa. Este mARN se transcribe de forma inversa con la ayuda de una enzima llamada *Transcriptasa Reversa* y se obtiene el segmento de ADN que le dio origen. A esta pieza se le conoce como *ADN complementario (cADN)*. Posteriormente, con la participación de otra enzima, la *ADN polimerasa*, es formada la cadena adicional para estructurar la doble hélice y entonces incorporarla a un determinado *Vector* de expresión (recombinación) con la ayuda de una *ADN ligasa* (Howles, 1996; Mulligan, 1993).

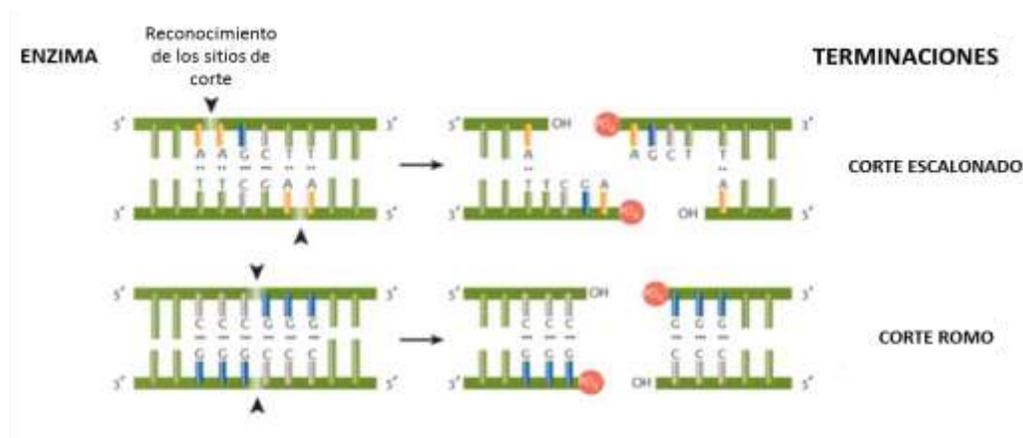


FIGURA 27: Cortes de restricción.
 Adaptado de *Tecnología de AND recombinante 3ª ed. (p. 334)*
 por Garrido, A. 2006, Tébar

Recombinación del ADN

Una vez que se obtiene el ADN en doble hélice del gen funcional de la proteína buscada se debe proceder a su incorporación en algún tipo de vector. A este proceso se le denomina *Recombinación* por la unión de dos fragmentos de ADN de orígenes distintos.

Un vector es un medio de transporte para llevar genes exógenos al interior de una célula huésped. Existen diferentes tipos de vectores: *plásmidos*, *bacteriófagos* y *cósmidos*. Los plásmidos son moléculas de ADN de doble cadena circular extra cromosomal presentes comúnmente en las bacterias y con la capacidad de replicarse independientemente del ADN bacteriano. No son imprescindibles para la vida de las bacterias y mientras algunas pueden no contener alguna otras pueden portar hasta 20. Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan a las bacterias y que como cualquier otro virus llevan una existencia intracelular obligada. La mayoría posee una molécula de ADN y pueden presentar dos estados funcionales: un estado virulento o un estado atemperado. En el estado virulento el virus se replica, ocasiona lisis de la célula huésped y libera a sus réplicas mientras que en el estado atemperado el virus se instala en el cromosoma bacteriano y se replica con él sin ocasionar alteración alguna a la bacteria (Garrido Pertierra et al., 2009; Mulligan, 1993).

Este estado es el requerido para que un bacteriófago pueda ser considerado como un vector idóneo. Los cósmidos son una combinación de los dos anteriores, es decir, un plásmido con segmentos agregados del genoma de un bacteriófago que conserva la capacidad replicativa del plásmido y que posee varios sitios de restricción donde se puede insertar ADN exógeno (Mulligan, 1993).

La elección del tipo de vector más conveniente para recombinación genética depende del tamaño del fragmento de ADN que se insertará pues mientras un plásmido puede soportar insertos de 8 a 10 kb un bacteriófago hace lo propio con 10 a 20 kb y un cósmido con 35 a 45 kb. El vector seleccionado es tratado con enzimas de restricción de corte escalonado permitiendo que sus extremos "adhesivos" se unan con los extremos de los fragmentos del ADN aislado mediante ADN ligasas (Garrido Pertierra et al., 2009).

El vector resultante es el vector recombinante que será transfectado a una determinada célula huésped para el proceso de clonación y amplificación (Garrido Pertierra et al., 2009) (FIGURA 28).

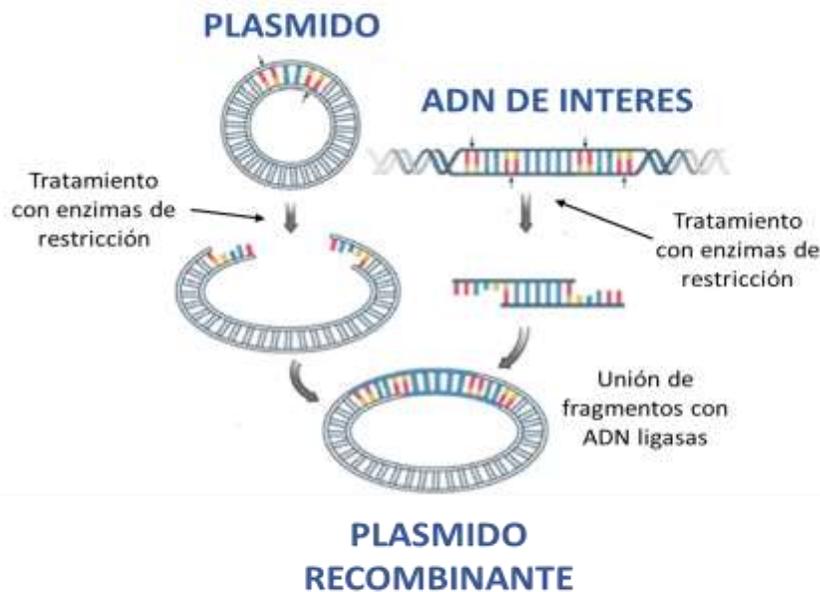


FIGURA 28: Creación de un vector plasmídico
Adaptado de *Tecnología de AND recombinante 3ª ed.*
(p. 342) por Garrido, A. 2006, Tébar

Transformación por transfección

Las células huésped pueden ser células procariontes o eucariontes y la elección de una u otra depende del propósito de la secuencia genética aislada. Se ha calculado que las células procariontes poseen una información genética modesta de aproximadamente 6000 genes lo cual las hace muy manejables y les permite una rápida duplicación en tan solo 20 minutos (Garrido Pertierra et al., 2009; Howles, 1996).

Sin embargo, las células procariontes no poseen los sistemas necesarios para la maduración de algunas proteínas, p.e. la glicosilación y sialilación de la FSH, por lo que la proteína producida puede no estar correctamente sintetizada y carecer de actividad biológica (Contreras Huamanyauri, 2019; Howles, 1996).

La síntesis de proteínas humanas requiere de la eliminación pos traduccional de la *Metionina (Met)*, aminoácido que da la señal al ribosoma para iniciar la síntesis proteica y que por tanto está incorporado en primera posición en todas las proteínas de origen humano. Las células procariontes carecen de esta capacidad. Aunado a todo lo anterior, las proteínas sintetizadas en una célula procarionte son excretadas en la periferia celular (periplasma) y no al medio de cultivo lo que obliga a mayores manipulaciones para aislar la proteína. Por todas estas desventajas la síntesis de proteínas complejas no es viable en células procariontes (Shoham & Insler, 1998).

En contraste, las células eucariontes si poseen la maquinaria celular necesaria que les brinda a las moléculas sintetizadas sus formas precisas y los procesos secundarios de maduración o complementación que necesiten para mantener su funcionalidad, su inocuidad y su actividad biológica por lo que son capaces de producir proteínas complejas (FIGURA 29).

EVENTOS POS TRANSCRIPCIONALES	CELULA		
	PROCARIONTE	EUCARIONTE	rFSH
Maduración proteica	SI	SI	✓
Secreción	NO	SI	✓
Remoción de Metionina	SI/NO	SI	✓
Puentes disulfuro	SI	SI	✓
Glicosilación	NO	SI	✓
Fosforilación	SI/NO	SI	
Amidación	NO	SI	
Carboxilación	NO	SI	
Heterodimerizacion	SI	SI	

FIGURA 29: Diferencias entre células procariontes y eucariontes frente a las necesidades en la síntesis de rFSH
Adaptado de Genetic engineering of human FSH (p. 182) por Howles, C.M. 1996, Hum Reprod 2 (2)

Esto permite cumplir con el objetivo de la ingeniería genética de obtener proteínas con las características exactas de las proteínas humanas (Howles, 1996).

Dentro de las células eucariontes las células de los mamíferos son las que cumplen con todas estas condiciones haciéndolas las más aptas para la síntesis de proteínas.

Clonación/Amplificación

Las primeras moléculas recombinantes que se crearon utilizaron plásmidos como vectores de expresión que posteriormente fueron transfectados en células bacterianas en 1973. Interesantemente, se observó que en la autonomía de los plásmidos para replicarse se conservaba intacta la información genética portada y esto marco el surgimiento de las técnicas de clonación molecular y genética que hoy en día constituyen las herramientas indispensables para la multiplicación de secuencias genéticas específicas (Garrido Pertierra et al., 2009).

La clonación genética es la generación de copias idénticas de una determinada molécula de ADN. Después de la transfección del vector en la célula huésped el ADN insertado comenzara a clonarse por la capacidad de auto replicación de los plásmidos y los plásmidos descendientes, a su vez, serán transmitidos a otras células por la propia multiplicación de estas.

La población celular creada por la multiplicación de las células transformadas se traduce en miles de copias de esta molécula de ADN y esto amplifica exponencialmente el gen del que se pretende obtener una proteína.

Esto constituye la base a partir de la cual puede lograrse la producción de una proteína a gran escala (Contreras Huamanyauri, 2019; Shoham & Insler, 1998).

Uno de los mayores alcances de la clonación genética es la posibilidad de replicar el genoma entero de un organismo, o bien, dividirlo en fragmentos y replicar cada uno de ellos.

Usualmente la bacteria *Escherichia coli* es una de las células huésped por elección y en una población de ellas es posible transfectar cada uno de los fragmentos del ADN del organismo nativo mediante un plásmido o un bacteriófago de tal manera que todas las bacterias en su conjunto con su colección de vectores portan el ADN completo del organismo de origen. La posterior multiplicación de la bacteria respeta todos los genes del fragmento de ADN integrado, incluso las secuencias de no codificación (intrones) y las secuencias repetidas (Howles, 1996).

De esta manera es posible crear “bancos” de información genética del genoma entero de un organismo a partir de los cuales pueden obtenerse fracciones más específicas de ADN, p.e. fracciones que codifiquen determinadas proteínas. Esto ha dado origen al concepto de las *Bibliotecas Genómicas* (Mulligan, 1993).

Actualmente existen *Bibliotecas Hipofisarias* conformadas por las colecciones del cADN (*Bibliotecas cADN*) de los genes que codifican algunas de las hormonas de esta glándula y de las cuales ya existen productos recombinantes comerciales: GH Genotonorm®, Humatrop®; TSH Thyrogen®; LH Luveris®; FSH Gonal F®, Puregon®. De forma general, se considera que la síntesis de gonadotropinas, FSH, LH y hCG, es la síntesis de proteínas más compleja realizada hasta el día de hoy con tecnología recombinante (Howles, 1996).

PRODUCCIÓN HORMONAL. SÍNTESIS DE UNA FSH RECOMBINANTE

Los genes para las cadenas α y β de la FSH fueron localizados en 1987 en los cromosomas 6 y 11 respectivamente del genoma humano y con esta información se inició la producción de las primeras preparaciones de rFSH incorporando la información genética que se consideró necesaria para la codificación de las cadenas en vectores separados que posteriormente se transfectaron en fibroblastos de ratón. Las preparaciones resultantes mostraron una especificidad FSH muy baja lo que obligo a reformar los métodos de aislamiento genético para garantizar la identificación de los genes completos α y β (Howles, 1996).

En la reestructuración de la metodología de aislamiento del ADN se eligió un bacteriófago como vector y la transfección se hizo en *Escherichia coli* para la clonación y amplificación. A partir de estos clones se construyó una biblioteca genómica permanente para FSH con la cual se logró la identificación y secuenciación del gen a mostrando una estructura constituida por cuatro regiones de codificación funcional, llamadas *Exones*, interrumpidas por tres regiones de no codificación denominadas *Intrones*. La secuenciación del gen β mostro una estructura formada por tres exones interrumpidos por dos intrones (Hedon et al., 1995; Howles, 1996).

Con la información específica y completa de ambas cadenas fue posible construir bibliotecas permanentes del correspondiente cADN (Howles, 1996; Mulligan, 1993).

Los Intrones son piezas extras de ADN contenidas en los genes de los mamíferos que no forman parte de la proteína a codificar, pero que se conservan en el *pre-ARN mensajero (pre-mARN)* para después ser escindidos del mRNA maduro antes de abandonar el núcleo y ser traducido como una proteína (Garrido Pertierra et al., 2009) (FIGURA 30).

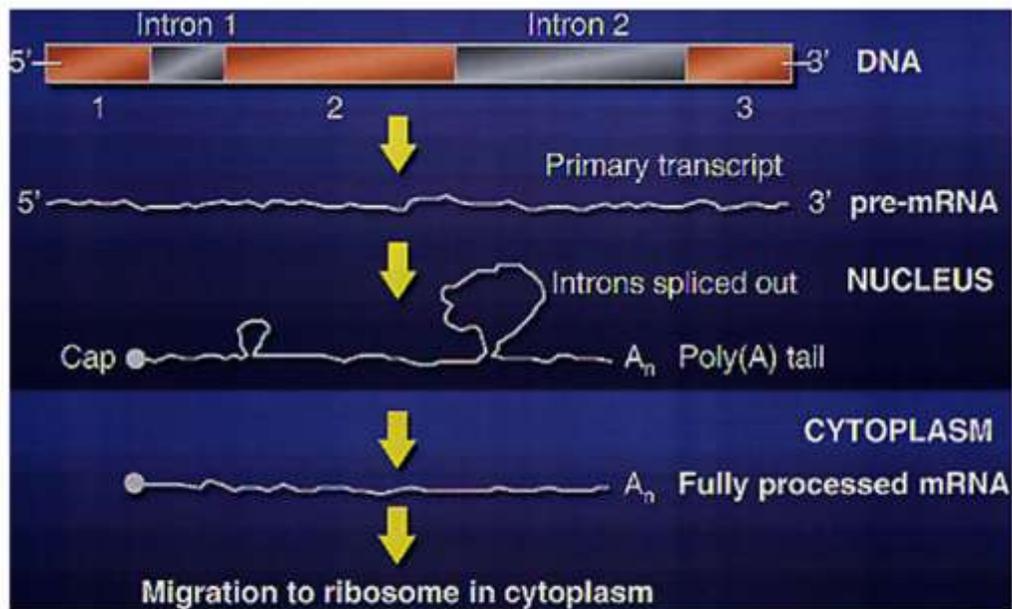


FIGURA 30: Estructura y expresión de un gen eucariota de mamífero en pre-mARN y escisión de sus intrones en el mRNA.
Adaptado de *Genetic engineering of human FSH* (p. 177) por Howles, C.M. 1996, *Hum Reprod* 2 (2)

Si bien el papel de los intrones en los genes aún permanece sin dilucidarse por completo, está demostrado que pueden influenciar la transcripción del mRNA debido a su asociación con otras fracciones de transcripción extra génica en el ADN, denominadas *Potenciadores ADN*, que indirectamente potencializan el inicio de la transcripción del gen. Esto da lugar a los también llamados *Potenciadores en el mRNA* (*eARN, enhancer ARN*) (Garrido Pertierra et al., 2009).

Algunos otros factores externos como los esteroides gonadales o la GnRH también pueden influenciar la tasa de degradación del mRNA. Todos estos factores quizá pueden explicar la alta tasa de expresión de las cadenas α , comparado a las tasas de expresión de las cadenas β , que existe en los gonadotrópos hipofisarios.

Debido a todo lo anterior, se decidió recombinar los genes completos (exones e intrones) en vectores separados especialmente diseñados con algunos genes de amplificación que pueden ser regulados por agregados externos en el medio de cultivo. En el caso del gen α se hizo una vinculación a los genes de la enzima *Dihidrofolato reductasa* (*DHFR*) la cual es necesaria para la síntesis de purinas como precursores de ácidos nucleicos (Fominaya, 2016; Howles, 1996) (*FIGURA 31*).

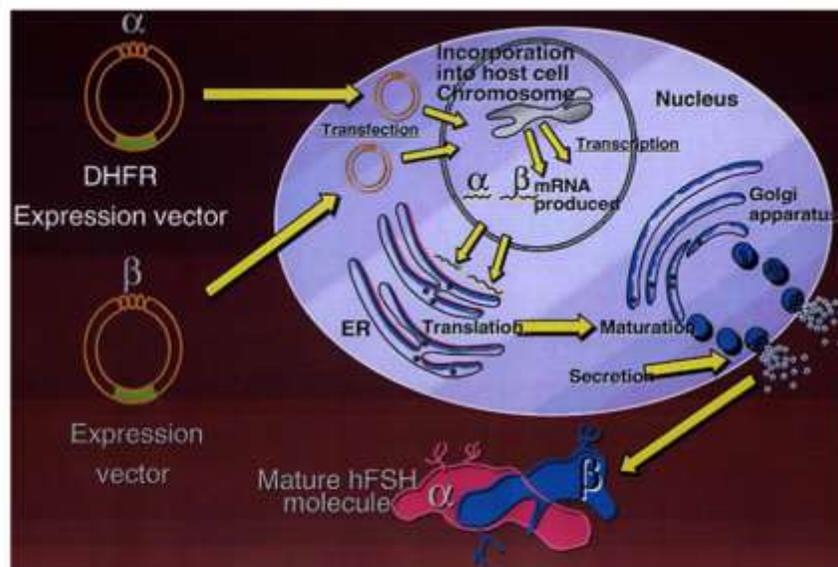


FIGURA 31: Producción de rFSH en células CHO.
Adaptado de *Genetic engineering of human FSH* (p. 180) por
Howles, C.M. 1996, *Hum Reprod* 2 (2)

Una vez creados, ambos vectores fueron co-transfectados en *células de ovario de hámster chino (CHO; Cricetulus barabensis)* las cuales son usadas extensamente en ingeniería genética para la producción de otras proteínas complejas tales como la eritropoyetina (Butler & Spearman, 2014; Mulligan, 1993; Shoham & Insler, 1998).

La elección de las células CHO para la síntesis de FSH obedece a varias razones. Estas células permiten una producción masiva de proteínas recombinantes pudiendo alcanzar entre tres y diez grs. de masa por cada litro de medio de cultivo, además de que su clonación es muy sencilla. Pero quizá la razón de mayor peso tras su elección es su deficiencia en DHFR.

Los medios de cultivo para células de mamífero suelen ser adicionados con algunos factores que estimulan la amplificación de sus vectores y que pueden ser la *Metionina (MET)*, la *Sulfoximina (MSX)* o el *Metotrexato (MTX)*. Este último es un inhibidor por competencia de la DHFR, de tal forma que cuando células carentes de DHFR, pero portadoras de un vector con este gen, son cultivadas en medios de cultivo adicionados con MTX, generan resistencia al factor y propician un proceso de selección de clonas competentes creando líneas recombinantes estables en menor tiempo. Si las concentraciones de MTX son incrementadas paulatinamente en el medio de cultivo, se incentiva, además, la amplificación del gen para DHFR (Garrido Pertierra et al., 2009; Howles, 1996).

Las células CHO transformadas demostraron ser genéticamente estables y con un nivel adecuado de productividad de rFSH, pero incluso dentro de todas las líneas celulares desarrolladas, se hizo una selección secundaria de las poblaciones celulares con mayor capacidad para ofrecer una secreción de FSH mas alta y estable y con ellas se estableció una línea celular basal de productividad denominada *Banco Celular Maestro (BCM)*. El BCM se constituye por numerosos viales que contienen células totalmente caracterizadas en términos de estabilidad genética y estructura, con potencialidades idénticas y que son criopreservadas hasta su utilización.

A partir de un vial único del BCM es posible correr todo un proceso de producción de rFSH tomando antes una alícuota que se deposita en un nuevo vial para su re-expansión y que se devuelve a criopreservación.

Al vial inicial se le denominó *Banco Celular de Producción (BCP)*. Ambos, BCM y BCP, son continuamente evaluados para certificar esterilidad, ausencia de mycoplasma y contaminantes virales en apego a la normativa de la FDA (*Federal Drugs Administration*) (Garrido Pertierra, 2009; Mulligan, 1993; Shoham & Insler, 1998).

El proceso de producción de rFSH a gran escala se dividió en dos fases:

- ❖ **ACONDICIONAMIENTO DE LA CLONA CELULAR:** El vial seleccionado como BCP fue transferido a un *Bioreactor* equipado con los parámetros precisos de cultivo (temperatura, saturación de oxígeno, humedad) así como con el medio de cultivo apropiado. Gradualmente la población celular comienza a expandirse conjuntamente con la producción de rFSH que se recuperó en pequeñas cantidades para su caracterización. La expansión celular se mantuvo en observación para garantizar que se alcanzara el número celular suficiente para el bioreactor, y una vez alcanzada la densidad requerida, se agregó medio de cultivo adicional para mantener la estimulación del crecimiento celular. Cada clona celular marca el lapso de tiempo particular que requiere para exhibir su productividad, y después de este tiempo, el medio de cultivo es cambiado gradualmente y recolectado para su posterior purificación.
- ❖ **PURIFICACION DE LA rFSH:** La purificación de la rFSH obtenida del medio de cultivo se dividió en seis fases, dos de ultrafiltración inicial y final y cinco más de cromatografía por inmunoafinidad siendo esta última la fase principal de purificación con la utilización de anticuerpos monoclonales murinos anti-FSH. Cada fase de purificación se evaluó rigurosamente para asegurar la consistencia del producto final (Garrido Pertierra et al., 2009; Howles, 1996) (*FIGURAS 32*).

La secuencia completa de los aminoácidos de las cadenas α y β de la rFSH final, así como la secuencia del ADN, se determinaron idénticas a las secuencias naturales, tanto urinarias como hipofisarias. Estudios de espectrometría de masas concluyeron que las masas moleculares de las cadenas α y β fueron de 14 y 17 kDa respectivamente (Howles, 1996).

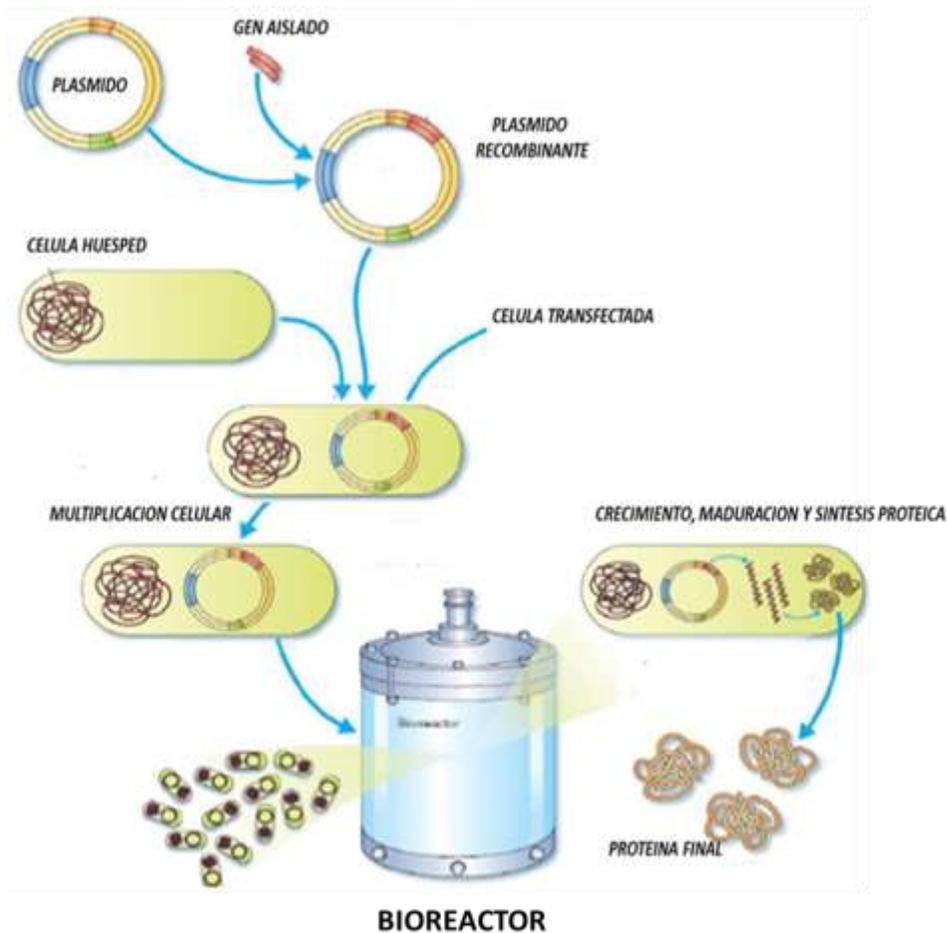


FIGURA 32: Cadena de trabajo en la producción de una rFSH
 Adaptado de Tecnología de AND recombinante 3ª ed. (p. 347)
 por Garrido, A. 2006, Tébar

En 1990 tuvo lugar la primera producción masiva para uso clínico de una rFSH en Suiza y en marzo de 1991 se utilizaron las primeras dosis clínicas.

En mayo de 1992 se reportaron en la revista *Lancet* los primeros embarazos de mujeres bajo tratamiento con FIV&TE en Suiza y Bélgica.

En 1993 se sometió el registro a nivel internacional y en 1994 se obtuvo la autorización para su uso a nivel mundial (Garrido Pertierra et al., 2009; Howles, 1996).

CREACIÓN DE UNA FSH RECOMBINANTE DE ORIGEN HUMANO

Hoy en día la aplicación de la reproducción asistida muestra una amplia versatilidad con diferentes opciones en sus técnicas y tratamientos para el abordaje de la pareja infértil. Ciertamente esta es una de sus grandes ventajas, pues al ser la infertilidad una patología tan multifactorial, la reproducción asistida prácticamente puede ofrecer una alternativa para casi todos los casos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la reproducción asistida aún tiene varios retos sin resolver en las diferentes facetas de sus procedimientos y quizá, dentro de estas, los retos que demandan mayor atención por su morbi-mortalidad son los inherentes a la HOC, el SHO y el embarazo múltiple (López-Ortiz, 2014).

Se ha postulado que la amplia heterogeneidad de isoformas de FSH que se obtienen en los modelos de producción recombinante actual, en células no humanas, puede ser uno de los potenciales factores causales en la incidencia del SHO por las respuestas ováricas tan variables que se pueden inducir, algunas de intensidad extrema, al tratarse de isoformas no humanas (Bosch et al., 2015; Frías Iniesta, 2008; Smitz et al., 2016).

Esta es la justificación central tras la investigación de esquemas de producción hormonal basados en líneas celulares humanas que básicamente entran en la cadena de producción recombinante como las células huésped en las que son transfectados los vectores para FSH y en las que se lleva a cabo la síntesis proteica bajo la maquinaria celular humana y con los patrones de maduración proteica (glicosilación-sialilación) humanos (Butler & Spearman, 2014) (FIGURA 33).

La línea celular humana elegida en la producción de FSH se denomina *PER.C6*. Estas células derivan de células retinales de embriones humanos de 18 semanas abortados espontáneamente en 1985 y que se desarrollaron y prepararon como líneas celulares de cultivo por transfección de la región E1 del adenovirus tipo 5 lo que les confiere un fenotipo inmortal debido a que su expresión ejerce inhibición sobre ciertos reguladores del ciclo celular e inhibe también la apoptosis (Koechling et al., 2017; Mercier S.M., 2016).

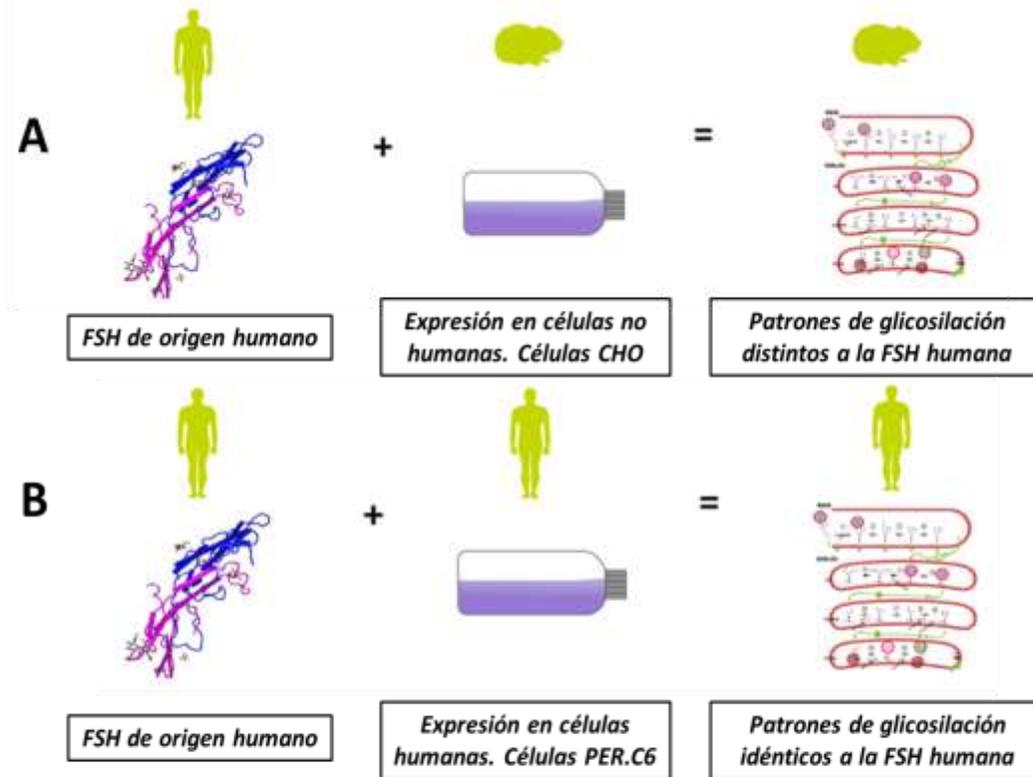


FIGURA 33: Procesos de producción recombinante comparados.
A. Proceso en células no humanas
B. Proceso en células humanas
 Tomado de REACH Module 3 Follitropin delta E-learning (p. 33) por Ferring Pharmaceuticals, 2017

En un inicio se utilizaron como líneas celulares de producción de vectores virales usados en vacunas de terapia génica y más tarde se optimizaron como líneas celulares de producción industrial a gran escala de proteínas terapéuticas como inmunoglobulinas y hormonas (Ross et al., 2012).

Las células PER.C6 ofrecen un rendimiento superior a otras células animales, no requieren de genes de amplificación para producir clonas estables con altos niveles de expresión proteica y un número bajo de copias es suficiente para sostener una producción de proteínas estable y eficiente (Koechling et al., 2017).

Una de las cualidades que las hace células de cultivo muy valiosas es que se adecuan a las modificaciones pos-transcripcionales humanas lo que permite que las estructuras agregadas de oligosacáridos no tengan potencial inmunogénico. Las células PER.C6 son fácilmente transfectables y tienen un alto perfil de seguridad por su origen bien definido y por sus protocolos de transformación en los que virus y priones han sido completamente excluidos (Butler & Spearman, 2014).

Su crecimiento puede darse de forma óptima en medios de cultivo libres de suero y de cualquier otra proteína de origen animal lo que facilita su cultivo a gran escala en bioreactores (Coco-Martin & Harmsen, 2008; Mercier S.M., 2016; Ross et al., 2012).

La tasa de producción hormonal de las células PER.C6 muestra un mayor rendimiento comparado a las células CHO. La obtención de 10 kg. de proteína purificada se obtiene tan solo en una corrida de producción con 500 L de medio de cultivo en la línea PER.C6, mientras que las células CHO necesitan 11 corridas para equiparar esta producción en el mismo volumen de medio (Coco-Martin & Harmsen, 2008) (FIGURA 34).

Se han desarrollado BMC de PER.C6 sobre los que se corren extensas pruebas de seguridad para la detección de agentes virales humanos, bovinos o porcinos, mycoplasma o adenovirus. Todas estas características hacen de la línea PER.C6 una célula de producción hormonal mucho más conveniente que la célula CHO (Coco-Martin & Harmsen, 2008).

Las secuencias de aminoácidos en la molécula de *FSH recombinante humana (rhFSH)* es idéntica a las secuencias de la FSH humana nativa y su contenido de ácido siálico es más alto comparado con la rFSH obtenida por células CHO lo cual concuerda de forma muy cercana con el patrón de sialilación humano (Bosch et al., 2008, 2015).

En el 2014 concluyó la investigación y el desarrollo de la primer FSH recombinante de origen 100% humano que, por el momento de su comercialización, después de la generación α y β , se denominó como *Folitropina Delta* y con ella se eliminó la mezcla de especies en el producto biológico final.

CAPACIDAD PRODUCTIVA COMPARADA		
	CHO	PER.C6
PRODUCTIVIDAD (pg/cel/día)	15	15
DENSIDAD CELULAR MAXIMA (X10 ⁶ por mL)	10	100
PROTEINA (mg/dL)	150	1500
RENDIMIENTO	0.5	0.5
PROTEINA EN MASA(g)	10,000	10,000
PROTEINA CRUDA (g)	20,000	20,000
VOLUMEN DE CULTIVO (L)	133,333	13,333
50 L CORRIDAS	107	9
100 L CORRIDAS	53	4
250 L CORRIDAS	21	2
500 L CORRIDAS	11	1

FIGURA 34: Capacidad productiva comparada entre células CHO y células PER.C6
Adaptado de A Review of Therapeutic Protein Expression By Mammalian Cells (p. 33)
 por Coco-Martin, J.M. 2008, Bio Pro Inter 3

La folitropina delta representa para la reproducción asistida la hormona de estimulación ideal que, comparada con la folitropina α en administración de dosis bioequivalentes, permite una concentración sérica de FSH más alta en cualquier momento de medición con una vida media más larga y una menor tasa de aclaramiento renal debida a las diferencias en la glicosilación entre ambos productos que genera una mayor proporción de estructuras tetra antenarias en la folitropina delta (Olsson et al., 2014; Ulloa-Aguirre & Timossi, 2000).

Con la folitropina delta la señalización endocrina sobre el ovario es por primera vez idéntica a la fisiología humana, pero esto solo es una parte de la estrategia de perfeccionamiento de las técnicas de estimulación ovárica para alcanzar la reducción en la incidencia del SHO y del embarazo múltiple.

La parte restante es el diseño de una dosificación menos variable que impacte de manera precisa sobre la reserva ovárica disponible.

DOSIFICACIÓN DE UNA FSH RECOMBINANTE DE ORIGEN HUMANO

Tras la administración de la FSH existen tres probables respuestas ováricas denominadas hipo respuesta (respuesta inferior a lo esperado), normo respuesta (respuesta dentro de lo esperado) e híper respuesta (respuesta que sobre pasa lo esperado). Cada tipo de respuesta es concordante con la calidad de la reserva ovárica, baja, normal o alta respectivamente. De forma ideal, la respuesta deseable tras un protocolo de estimulación ovárica, es la normo respuesta porque dentro de sus límites inferior y superior es posible la obtención de un número adecuado de óvulos con un mínimo riesgo de incidencia de SHO. En la hipo respuesta el número de óvulos obtenidos puede ser deficiente, mientras que en la híper respuesta existe un alto riesgo de incidencia de SHO (La Marca & Sunkara, 2014).

No existe un consenso cuantitativo sobre cuál debe ser la respuesta ovárica en la normo respuesta. Se ha sugerido que las mujeres que producen entre cuatro a nueve óvulos por ciclo de estimulación deberían ser categorizadas como respuestas subóptimas, mientras que los resultados de varios trabajos sugieren que la ventana de la normo respuesta debe ir desde 6 hasta 15 óvulos recuperados (Blumenfeld, 2015; Chambers et al., 2011; Chen et al., 2015; Devroey & Van Steirteghem, 2004; Drakopoulos et al., 2016; Ji et al., 2013; La Marca & Sunkara, 2014; Polyzos & Sunkara, 2015; Stanger & Yovich, 2013).

A pesar de lo anterior, las mejores tasas de embarazo se han alcanzado en aquellas mujeres que produjeron entre 9 y 14 óvulos, de acuerdo al análisis de 400,135 ciclos de tratamiento (Sunkara et al., 2011).

Debido al peso de esta evidencia el rango de 9 a 14 óvulos se estandarizó como la normo respuesta ovárica a obtener en un protocolo de estimulación con el menor riesgo de SHO.

Desafortunadamente, el rango de norma respuesta de cada mujer es tan individual como lo es su reserva ovárica por lo que resulta altamente pretencioso suponer que un mismo esquema de dosificación hormonal pueda ser igualmente efectivo o inefectivo en una población heterogénea.

Un fenómeno bien establecido en la HOC, es la amplia variedad de respuestas endocrinas que pueden dar diferentes mujeres a una misma dosis de FSH y que no siempre caen en el rango óptimo de la norma respuesta debido a las marcadas diferencias individuales en la reserva ovárica de cada una de ellas (Arce et al., 2016; Bosch et al., 2015; Seifer & Tal, 2016) (FIGURA 35).

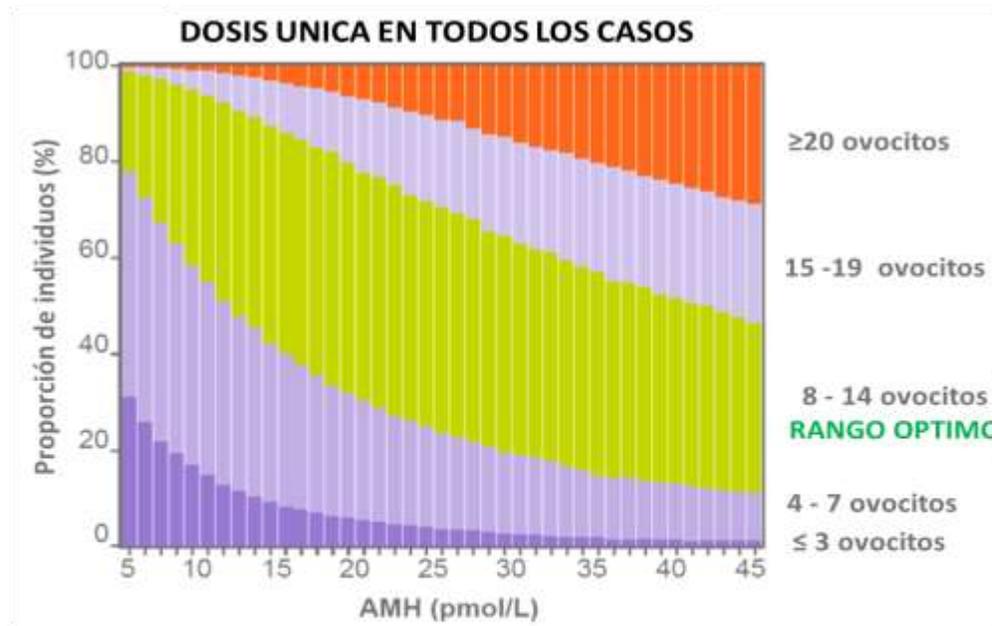


FIGURA 35: Respuesta ovárica ante una misma dosis de FSH a diferentes individuos. Existen amplias variaciones en función de la reserva ovárica y la AMH.

Adaptado de *Anti-Mullerian Hormone* (p. 339) por Seifer, DB. 2016, Nova Science Publishers Inc.

La variabilidad de muchas de estas respuestas puede incluso generar respuestas extremas e inesperadas que tienen implicaciones en la eficacia y la seguridad de los tratamientos.

Un análisis retrospectivo de 650,000 tratamientos de reproducción asistida demostró que las tasas de nacidos vivos estaban relacionadas negativamente con la variabilidad de la respuesta a la estimulación de las gonadotropinas y al número de ovocitos recuperados (Baker et al., 2015) (FIGURA 36).

A dosis totales más elevadas de gonadotropinas la recuperación de ovocitos es menor al igual que la tasa de nacidos vivos.

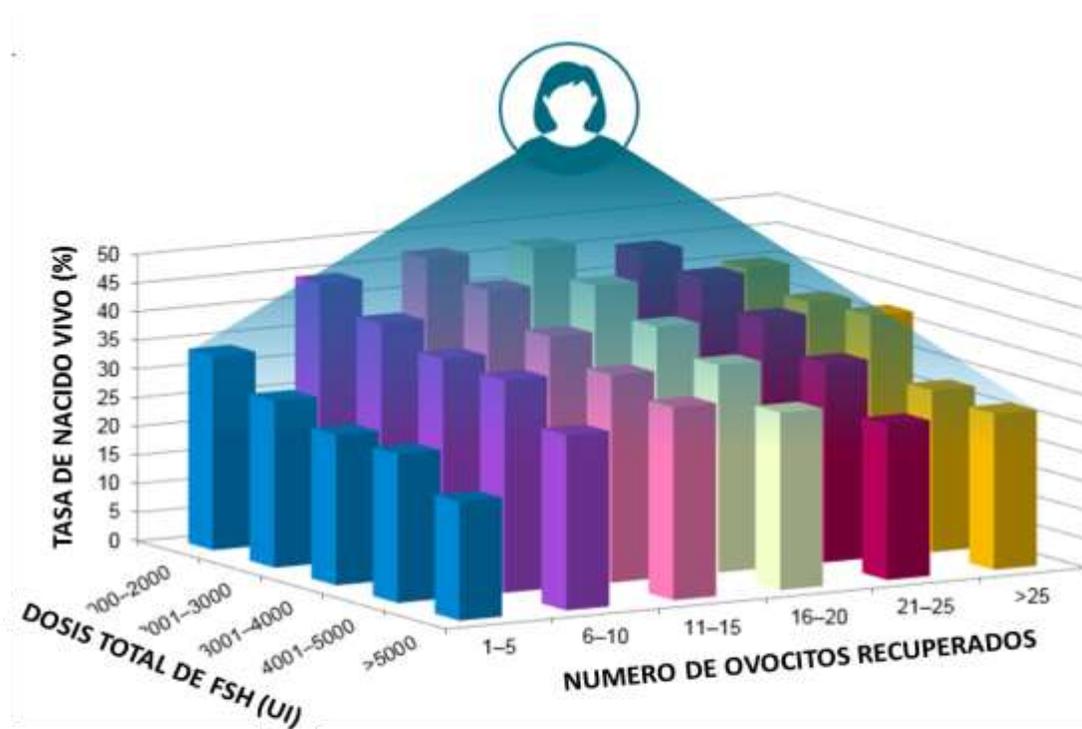


FIGURA 36: Relación negativa entre la tasa de nacido vivo y las dosis de gonadotropinas administradas. Nótese que el número de ovocitos recuperados también resulta afectado.
Adaptado de Gonadotropin dose is negatively correlated with live birth rate: analysis of more than 650,000 assisted reproductive technology cycles (p. 1147) por Baker, VL. 2015; Fertil Steril 104 (5)

Los protocolos de estimulación actuales son generalizantes y las dosis hormonales están protocolizadas por lo que diferentes mujeres suelen tener las mismas dosis de FSH en sus tratamientos sin la aplicación de algún parámetro que indique la suficiencia o la insuficiencia hormonal.

En otras palabras, los protocolos actuales, difícilmente ejercen una estimulación que acierte en un rango óptimo de norma respuesta. Esto lleva a mantener una vigilancia expectante de la respuesta obtenida para hacer las modificaciones que se requieran en la dosis de FSH. De generarse una respuesta extrema, que posterior a los ajustes que pudieran hacerse no cambie su curso, se puede llegar a la cancelación del ciclo con el consecuente impacto económico y esta es una circunstancia que se presenta de forma frecuente. Todos estos datos refrendan la necesidad de administrar dosis más específicas, con un menor rango de variabilidad que permita en consecuencia una mayor predictibilidad sobre la respuesta ovárica (FIGURA 37).

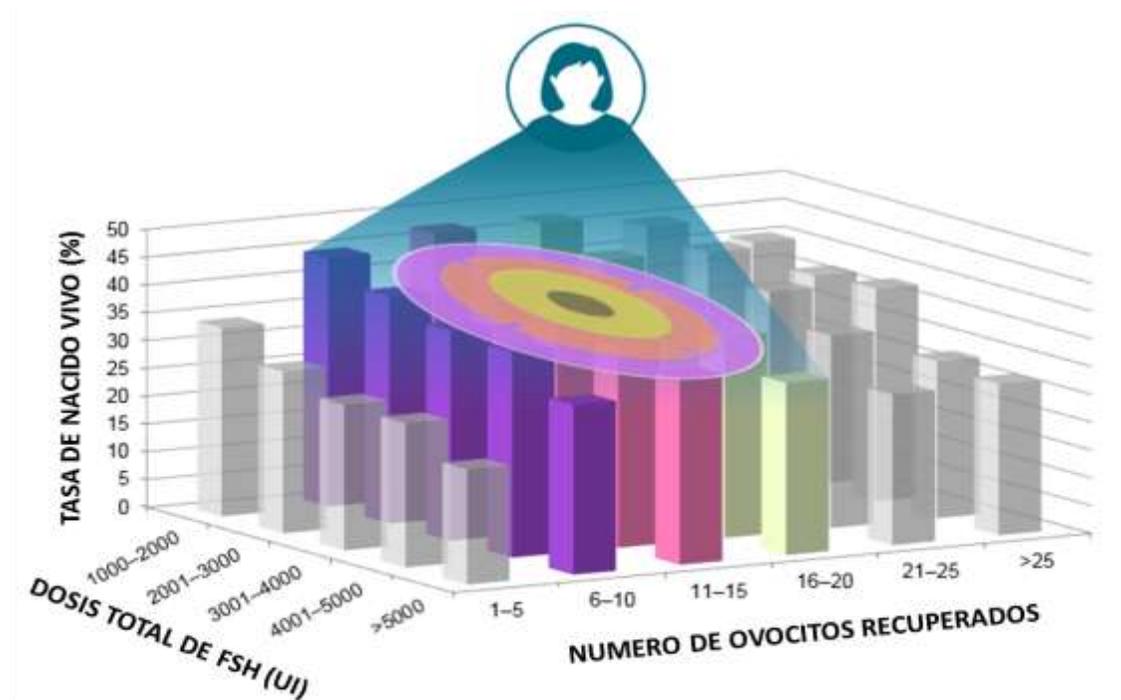


FIGURA 37: Un enfoque personalizado disminuye la variabilidad en la respuesta ovárica haciéndola mas predecible.
Adaptado de Gonadotropin dose is negatively correlated with live birth rate: analysis of more than 650,000 assisted reproductive technology cycles (p. 1150) por Baker, VL. 2015; Fertil Steril 104 (5)

La predictibilidad individual es el primer paso hacia una atención personalizada en biología reproductiva porque permitiría establecer dosis individualizadas de FSH para cada mujer y esto tiene una importancia crucial porque la personalización de los protocolos de estimulación ovárica, sumada a una rhFSH con una señalización humanizada, conduciría a la reducción sustancial de la incidencia del SHO, así como del embarazo múltiple (Bosch et al., 2015; Fauser, 2017).

Establecer un enfoque personalizado requiere de la consideración de datos moleculares y biológicos más precisos y que en consecuencia permitan tener a la persona correcta con el tratamiento correcto a la dosis correcta en el momento correcto. Para este fin, el uso de determinados *Biomarcadores* ha resultado de amplia utilidad. Un Biomarcador se puede definir como una característica biológica, fisiológica o bioquímica medible, propia y distintiva de un individuo, y que permite identificar procesos o brinda certeza sobre un aspecto particular (Strimbu & Tavel, 2010).

Existen diferentes tipos de Biomarcadores: de diagnóstico, de pronóstico, predictivos o farmacodinámicos. En Biología Reproductiva se prefiere el uso de Biomarcadores de tipo Predictivo porque brindan gran utilidad al establecer las probabilidades de que una determinada respuesta se presente a un tratamiento dado, o bien, para valorar eficacia o toxicidad de un tratamiento específico. Su uso permite tomar decisiones clínicas (Pokorska-Bocci et al., 2014; Strimbu & Tavel, 2010).

El *Biomarcador Predictivo* más útil en protocolos de estimulación ovárica es, sin duda alguna, la *Hormona Antimülleriana (AMH AntiMüllerian Hormone)*.

La AMH es una glicoproteína dimérica que pertenece a la superfamilia de los *Factores de Crecimiento Transformador Beta* o *TGF- β* . En la etapa fetal es producida por las células de Sertoli que a su vez provienen del epitelio superficial de la gónada primitiva.

Es una hormona determinante en la diferenciación sexual pues actúa sobre los conductos paramesonéfricos de Müller y obliga a su involución favoreciendo el desarrollo de los conductos mesonéfricos de Wolff de los cuales derivarán los genitales masculinos.

En ausencia de la AMH los conductos que involucionan son los de Wolff mientras que los conductos de Müller prevalecen dando lugar a los genitales femeninos internos.

Después del nacimiento, la AMH comienza a incrementarse progresivamente y alcanza su cenit alrededor de los 20 años de edad. Durante la niñez y la pubertad de la mujer la AMH es producida por las células de la granulosa de los folículos ováricos preantrales y antrales y se secreta a la circulación en cantidades suficientemente altas para ser detectadas. A partir de entonces, y hasta la llegada de la menopausia, la AMH va declinando gradualmente (Hudson et al., 1990; Sadler & Langman, 2016).

Este comportamiento está directamente relacionado con el proceso de foliculogénesis que inicia en la pubertad y con el cual el *pool* de folículos primordiales congénitos, o reserva ovárica, va decreciendo a lo largo de los años. Con cada ciclo ovárico una porción de folículos primordiales inicia su desarrollo a folículos preantrales y antrales y una cantidad determinada de AMH es secretada a la sangre. Con el paso del tiempo se reduce la reserva ovárica lo que se traduce en la reducción concomitante de los folículos disponibles para madurar secretores de AMH y de su calidad. La llegada de la menopausia no es sino la señal de una reserva ovárica exhausta donde la secreción de AMH es mínima o inexistente (Hudson et al., 1990).

Es por todo lo anterior que la AMH es un excelente biomarcador predictivo del potencial reproductivo de una mujer en un momento dado.

En el 2006 los trabajos de Howles y Todorovic describieron el análisis de los factores que pueden influir sobre la respuesta obtenida a la estimulación hormonal identificando al índice de masa corporal, el nivel basal de FSH, la edad y la cantidad de folículos menores a 11mm. como las variables más importantes para el diseño de un algoritmo que permitiera el cálculo de la dosis de inicio de la folitropina a (Howles, 1996; Popovic-Todorovic et al., 2003).

Más tarde, en 2016 durante la fase dos de la investigación de la folitropina delta, Nyboe Andersen et.al., publican los resultados de su trabajo en el que analizan de forma comparada las dosis individualizadas vs. las dosis convencionales de folitropina a y folitropina delta.

La dosificación se basó en el algoritmo previamente diseñado, pero incluyendo la influencia del valor clínico de la AMH y del peso corporal para la folitropina delta dada la relación negativa que la masa corporal muestra en la farmacodinamia de algunos parámetros como el volumen folicular total y los niveles de estradiol, Inhibina A e Inhibina B (Nyboe Andersen et al., 2017).

Concluyen que las dosis de folitropina delta, individualizadas de esta manera, no son inferiores en su efectividad a las dosis de folitropina a y queda asentada la utilidad de la AMH y del peso corporal en la individualización de las dosis de folitropina delta.

En 2016 Arce aplica estos hallazgos para individualizar las dosis de folitropina delta en una población bajo tratamiento de reproducción asistida y las relaciona con el tipo de respuesta ovárica obtenida. Interessantemente, sus resultados confirman que la individualización de la dosis de folitropina delta permite alcanzar de forma efectiva el rango propuesto de 9 a 14 óvulos como respuesta óptima en la mayoría de las mujeres bajo tratamiento minimizando significativamente la hipo e hiper respuesta y con ello la incidencia de SHO y el embarazo múltiple (Arce et al., 2016) (FIGURA 38).

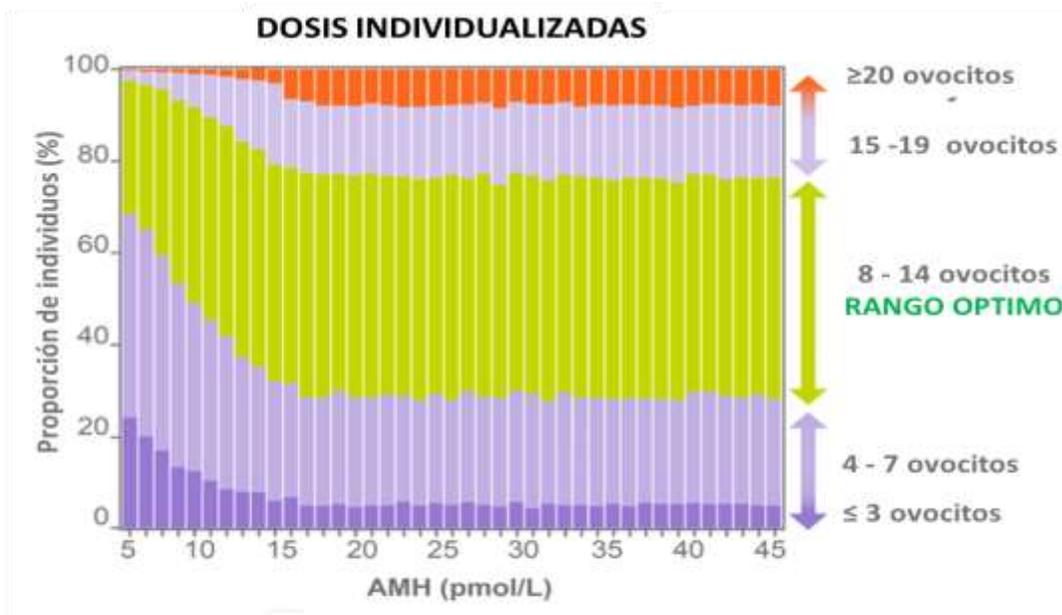


FIGURA 38: Respuesta ovárica a cada dosis individualizada. Las respuestas se estabilizan y son mas homogéneas.
Adaptado de *Anti-Mullerian Hormone* (p. 344) por Seifer, DB. 2016, Nova Science Publishers Inc.

Con estos resultados queda demostrada la amplia utilidad de la AMH en la personalización de la dosis de una rhFSH y en el logro de los objetivos de reducir la variabilidad entre dosis, incrementando su especificidad y permitiendo con ello una mayor predictibilidad sobre la respuesta ovárica obtenida.

En resumen, la dosificación de la folitropina delta se obtiene mediante la alimentación de un algoritmo patentado con el valor clínico de la AMH y el valor nominal del peso corporal de la mujer bajo tratamiento. El valor obtenido es la dosis que deberá ser aplicada en su protocolo de estimulación y que al ser tan específica, única y personal no requiere de ajustes haciéndola prácticamente una dosis fija durante todos los días de su aplicación.

De esta manera, la aplicación de una rhFSH con una dosificación personalizada basada en el valor de la AMH, representa una novedosa alternativa en los protocolos de estimulación ovárica que por primera vez mimetiza de forma muy cercana los procesos fisiológicos humanos.

EFFECTOS DE UNA FSH RECOMBINANTE DE ORIGEN HUMANO

La producción de la folitropina delta a partir de células humanas (PER.C6) es la razón fundamental de sus diferencias biológicas con respecto a todas las demás preparaciones sintéticas de FSH disponibles en la actualidad y que se pueden resumir en la expresión de patrones de glicosilación y sialilación afines a los patrones de maduración proteica humana. Estas diferencias generan una señalización distinta sobre el receptor con efectos biológicos también distintos (Sandström et al., 2013).

Tras su administración, la folitropina delta presenta un mayor tiempo de exposición en sangre debido a la reducción de las tasas de eliminación renal y hepática por la predominancia de isoformas ácidas y la estructura tridimensional tetra antenaria de la molécula. El predominio de isoformas ácidas guarda una similitud sumamente cercana con lo observado en la fisiología humana donde también existe predominio de isoformas ácidas en la fase folicular temprana y en la fase lútea tardía.

Ambas fases son determinantes en el desarrollo folicular (Olsson et al., 2014; Ulloa-Aguirre et al., 1992).

La afinidad y el grado de unión que muestra la folitropina delta por su receptor parece ser muy similar a lo que exhiben otras folitropinas, pero los efectos biológicos difieren quizá por la inducción de una señal también diferente. Estos aspectos combinados generan un perfil farmacológico único para la folitropina delta que ha mostrado tener una relación positiva con la reserva ovárica lo que explica la necesidad de determinar la AMH en la mujer para el establecimiento de la dosis a administrar (Arce et al., 2016; De Mora & Fauser, 2017; Koechling et al., 2017; Sandström et al., 2013).

De esta manera, la dosis establecida estimula el desarrollo folicular, pero siempre dentro de un límite aparentemente marcado por la AMH. Esto significa que, incluso con un incremento de dosis de la folitropina delta, el número de óvulos obtenidos no muestra cambios lo que sugiere la existencia de un probable umbral de respuesta para la folitropina delta que se postula está relacionado al perfil farmacológico.

El estímulo que la folitropina delta ejerce sobre el desarrollo folicular conduce a la obtención de un número óptimo de óvulos con un volumen promedio mayor al que se alcanza con otras folitropinas. Notablemente, se ha observado que el número de óvulos desarrollados no guarda ninguna relación con la calidad de los blastocistos que pueden desarrollarse. Esto probablemente significa que la calidad y tamaño promedio de los óvulos desarrollados es lo que se relaciona a la calidad de los blastocistos independientemente del número que se genere (Arce et al., 2016).

La administración de folitropina delta también tiene efectos positivos sobre varios parámetros endocrinos. Los niveles séricos de Inhibina A y B se incrementan, así como los niveles de estradiol (Olsson et al., 2014; Sandström et al., 2013).

De acuerdo a los datos de Steward y cols., quienes analizaron la relación entre el número de óvulos recuperados y la tasa de SHO y nacidos vivos en 256,381 casos, la personalización de la dosis de folitropina delta con base en el nivel de la AMH permitió que el 40% de las mujeres bajo tratamiento respondieran dentro del rango óptimo de 9 a 14 óvulos obteniendo en promedio 11 óvulos viables.

Adicionalmente, sus resultados demostraron que la obtención de un número superior a 15 óvulos con folitropina delta conduce a incrementos significativos en la incidencia de SHO por lo que el margen de respuesta que brinda es clínicamente más conveniente al resto de las folitropinas (Steward et al., 2014).

EXPERIENCIA COMPARADA DEL USO DE UNA FSH RECOMBINANTE EN SUS DIFERENTES TIPOS

Revisar la experiencia acumulada en más de medio siglo de uso de preparaciones hormonales nos remite inevitablemente a una extensa revisión bibliográfica de los múltiples estudios que han evaluado los protocolos de estimulación ovárica a nivel mundial y que en buena medida reflejan la experiencia clínica con estos productos.

En México, y a pesar del crecimiento exponencial que ha tenido la asistencia clínica en reproducción desde 1988, obtener un panorama sobre la experiencia y los resultados logrados se vuelve una tarea compleja dado el hermetismo que prácticamente todas las clínicas guardan sobre sus prácticas y resultados (Vite Vargas et al., 2005).

El uso de las preparaciones recombinantes de FSH dio inicio prácticamente desde su salida al mercado en la década de los 90's y después de 10 años de experiencia clínica fue posible tener una primera visión comparada entre la eficacia y seguridad de estos tratamientos. Quedo claro entonces que el conocimiento profundo de los aspectos bioquímicos, funcionales y estructurales de las gonadotropinas era necesario para su uso clínico racional particularmente en la atención a la infertilidad (Koechling et al., 2017).

El uso de la tecnología recombinante permitió el desarrollo acelerado de análogos hormonales con amplios potenciales terapéuticos.

En el año 2001 una revisión Cochrane comparo las tasas de embarazo y seguridad entre las gonadotropinas urinarias y recombinantes en la estimulación ovárica para ciclos de FIV&TE e ICSI. Esta revisión analizó los resultados de 18 estudios aleatorizados que en conjunto incluyeron 3421 mujeres.

Las tasas de transferencia embrionaria y embarazo en curso fueron más favorables para la rFSH que para la uFSH con un incremento relativo del 14%, mientras que la incidencia del SHO fue comparable entre ambas preparaciones (Daya, 2002).

Existen numerosos trabajos publicados que comparan el número de óvulos recuperados, así como las tasas de embriones transferidos, embarazo en curso y los perfiles de seguridad en relación a la incidencia del SHO entre uFSH y rFSH. En varios de estos trabajos los resultados obtenidos se muestran muy comparables y de no inferioridad entre ambas preparaciones de FSH, mientras que en otros estudios los resultados muestran tasas más favorables para la rFSH en alguno de los aspectos analizados o en todos, pero en ningún caso existe evidencia de inferioridad de la rFSH con respecto a la uFSH (Frías Iniesta, 2008; Hedon et al., 1995; Smitz et al., 2016; Wely et al., 2011).

En el año 2011 una nueva revisión Cochrane, que incluyó los datos de 42 estudios controlados y aleatorizados de 9600 parejas en total, analizó los resultados obtenidos en tasas de embarazo y perfiles de seguridad con el uso tanto de uFSH como rFSH en los protocolos de estimulación ovárica para ciclos de FIV e ICSI (Wely et al., 2011).

Esta revisión cuenta con un alto grado de evidencia de acuerdo a los Criterios GRADE (*Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*). Los estudios fueron agrupados para analizarse de acuerdo a la folitropina empleada en los protocolos de inducción, uFSH o rFSH. Las tasas de nacidos vivos y de embarazos en curso fueron muy similares entre ambos grupos, así como la tasa de embarazo clínico. No existen diferencias significativas entre ambos tratamientos en el número de ovocitos recuperados individualmente o en el número de embriones que son capaces de implantar. Los resultados del perfil de seguridad, sobre todo la incidencia de SHO, también fueron muy similares.

Durante la década pasada fueron publicados estudios adicionales que mantienen el interés por comparar los perfiles de eficacia y seguridad de las preparaciones urinarias frente a las preparaciones recombinantes, tanto α como β .

Estos estudios guardan un enfoque mayormente comercial debido a la producción de nuevas marcas sobre todo de tipo recombinante (Balen et al., 2007; Berger et al., 1999; Bergh et al., 1997; Daya, 2002; Dickey et al., 2002; Out et al., 1995).

Los resultados son concordantes con lo anteriormente descrito, es decir, no existen diferencias significativas entre un tipo de preparación y otro. Sin embargo, el surgimiento de una preparación de FSH con un origen 100% humano abrió nuevas expectativas en los protocolos de estimulación de reproducción asistida lo que dio lugar a una nueva generación de estudios comparativos.

La folitropina delta emerge al mercado internacional en medio de un gran escepticismo sobre su distinta estructura molecular asociada a una señalización endocrina apegada a la fisiología humana y sobre sus efectos biológicos diferenciales ligados a su origen. En pocos años de experiencia clínica internacional desde el inicio de su comercialización, se ha logrado confirmar que la necesidad de la medición de la AMH para la definición de una dosis de administración estaba justificada.

Cerca del 50% de las mujeres que fueron tratadas con folitropina delta tuvieron una respuesta ovárica considerada como óptima permitiendo el desarrollo de 11 óvulos en promedio y se observó también una minimización importante en el riesgo del SHO (Bissonnette et al., 2021; Bosch et al., 2015; Koechling et al., 2017; Liss et al., 2017).

Comparativamente a las demás folitropinas, este tipo de respuesta ofrece mayor conveniencia clínica pues cumple con los objetivos comprometidos de ofrecer un número manejable de óvulos y reducir el riesgo de SHO. Los perfiles endocrinos también se han visto mejorados con el uso de la folitropina delta con un incremento en los niveles séricos de estradiol, Inhibina A, Inhibina B y progesterona que generan un microambiente endocrino propicio que favorece la implantación del embrión (Bissonnette et al., 2021; Bosch et al., 2015).

Sin embargo, a pesar de todas estas diferencias con respecto al resto de las folitropinas disponibles en el mercado, las tasas de embarazo y nacidos vivos son muy comparables entre todas ellas.

Con la experiencia clínica hasta hoy acumulada se cree que el verdadero beneficio de la folitropina delta radica en permitir que mujeres con respuestas sub óptimas, ya sea hipo o híper respondedoras, puedan orientar su respuesta ovárica hacia el rango óptimo gracias a una dosificación personalizada de una FSH de origen humano, condición que anteriormente no era posible dadas las dosificaciones hormonales tan estandarizadas que inducen respuestas tan ampliamente variables.

ANALISIS COSTO-BENEFICIO DE UNA FSH RECOMBIANTE

En México, la atención de la pareja infértil, casi de forma absoluta, ha quedado en manos de instituciones de carácter privado. El sistema de salud en México solo ha fomentado el desarrollo y la investigación en biología reproductiva humana en unos pocos centros a nivel nacional, que se ven permanentemente rebasados ante una demanda por sus servicios cada vez más creciente. Es por esto que aquellas parejas afectadas por infertilidad se ven en la necesidad de recurrir a servicios privados con un costo generalmente elevado, pero que también depende del grado de severidad de la infertilidad y de la causa subyacente.

En México es difícil hacer un análisis sobre los costos reales de los diferentes tratamientos de reproducción asistida por el alto hermetismo que guardan las clínicas a este respecto, así como por diferentes planes de crédito o "paquetes" que suelen ofertar y que pulverizan los costos reales entre los intereses. Incluso los costos pueden tener variaciones significativas entre clínicas.

Uno de los tratamientos técnicamente más simples, como un coito programado puede ascender a \$30,000 pesos entre consultas, estudios y medicamentos. A partir de aquí los costos se vuelven ascendentes. La inseminación intrauterina con semen homólogo puede ascender a \$50,000 pesos, pero si es realizada con semen heterólogo puede incrementarse hasta los \$65,000 pesos. Técnicas de moderada complejidad como el FIV&TE pueden costar cerca de \$150,000 pesos, mientras que técnicas de alta complejidad como el ICSI pueden cotizarse en \$350,000 pesos. Algunos procedimientos o condiciones adicionales pueden contribuir a un alza en los costos tales como la selección del sexo, IMSI, oligospermia severa o Diagnóstico Genético Preimplantatorio. Aunque los protocolos de estimulación ovárica hoy en día son más variados en cuanto a los tiempos de aplicación, el tipo de fármacos que se requiere se mantiene más o menos constante con la necesidad de un agonista o un antagonista, preparaciones de FSH, LH, hCG y progesterona para soporte lúteo. Esto puede tener un costo de entre \$30,000 y \$40,000 pesos adicionales.

Sin embargo, si la causa de infertilidad es más compleja o se presenta factor masculino y femenino combinado, los costos tienen aún otro incremento significativo. Aunado a lo anterior, está plenamente aceptado que posibilidades del 35% de éxito en los procedimientos son apenas alcanzables después de tres ciclos de tratamiento, es decir, después de tres intentos con sus correspondientes costos (González & Serrano, 2010; Kably Ambe et al., 2012; Peña, 2019).

De acuerdo a datos de la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), en México el 19% de la población es de clase alta mientras que un 45% pertenece a la clase media donde los problemas de infertilidad tienen un impacto importante (Salvatori & Manfredi, 2019).

Con todos estos datos, es fácil entender el impacto económico que un tratamiento de reproducción asistida representa para una pareja, pero es más abrumante su apreciación cuando las estadísticas afirman que se requieren tres intentos para lograr 35% de posibilidades de embarazo y más aún cuando los ciclos deben ser cancelados por alguna razón que ponga en riesgo la vida de la madre.

Un ciclo de tratamiento puede cancelarse por diversas razones, pero aquellas que son inherentes al manejo realizado sobre la pareja pueden ser la obtención de un número muy elevado de óvulos (existen casos reportados de 30 óvulos desarrollados) lo que propicia un alto riesgo de embarazo múltiple, manejo inadecuado del semen, que puede desproveer de espermatozoides con los cuales fecundar, incapacidad lútea y por supuesto por la presencia de signos tempranos de SHO, el cual puede incluso ser de consecuencias mortales.

A excepción del manejo del semen, que es un proceso operador-dependiente, el resto de las causales se relaciona con el manejo hormonal.

Dentro de las ventajas diferenciales que la folitropina delta ofrece, la predictibilidad de la respuesta ovárica es una de ellas. Predecir esta respuesta implica tener la capacidad de generar una cantidad de óvulos suficientes para realizar el procedimiento dejando muy pocos óvulos o ninguno en la disyuntiva de transferirlos, donarlos, congelarlos o incluso abandonarlos.

Asimismo, al incorporar el valor de la AMH en el establecimiento de la dosificación es posible prever alguna respuesta extrema que pueda conducir a SHO.

Dado que la folitropina delta maneja una dosificación individualizada con base en el valor de la AMH, su efecto se mantendrá dentro del rango óptimo fisiológico que la AMH marque para cada mujer. Algunos estudios que han evaluado la incidencia del SHO con la folitropina delta confirman que el riesgo se minimiza cuando se compara con el resto de las folitropinas (Koechling et al., 2017; Nyboe Andersen et al., 2017).

Por todo lo anterior, la inclusión de una folitropina que pueda reducir los riesgos de cancelación del ciclo por respuestas excesivas puede ser altamente conveniente para médicos tratantes y para las parejas bajo tratamiento.

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Una de las premisas en reproducción asistida es mantener un apego lo más cercano posible a la fisiología humana en un intento por imitar los micro ambientes que naturalmente favorecen el desarrollo embrionario. Sin duda alguna, el factor más determinante en estos micro ambientes, es el papel de la FSH, por su función tan relevante en el desarrollo y maduración folicular.

Analizando la amplia variedad de preparaciones de FSH disponibles en el mercado hoy en día es posible apreciar amplias ventajas de la FSH recombinante sobre la FSH urinaria debido en gran medida a su mayor grado de pureza, su actividad específica y la mayor homogeneidad entre lotes. La experiencia clínica a nivel mundial dice que todas son eficaces, pero nunca las menotropinas, solas o combinadas, han demostrado ser más eficaces que las recombinantes y esto es lo que permite su extenso dominio comercial.

El reciente desarrollo de líneas celulares de cultivo con un origen totalmente humano representa una novedosa alternativa en la atención de necesidades no satisfechas en la reproducción asistida tales como una estimulación más cercana a la fisiología humana y la inducción de respuestas más predecibles con mínimos riesgos.

Este objetivo parece cumplirse pues como se analizó en este trabajo, los diferentes patrones de glicosilación y sialilación que otorga una célula de cultivo de origen humano, parecen brindar ventajas biológicas únicas que son determinantes en la señalización sobre sus receptores y cuyos efectos biológicos apenas comienzan a entenderse a profundidad.

Con estas características, la folitropina delta ofrece un control más preciso en la estimulación ovárica exógena donde una relación dosis-respuesta positiva permite que con su administración se desarrolle un número óptimo de óvulos competentes, un mejor perfil endocrino de soporte y todo ello con la minimización del riesgo del SHO.

Debido al corto tiempo de comercialización que hoy en día tiene la folitropina delta, afirmar que su uso puede evitar la cancelación de ciclos por respuestas ováricas extremas, puede ser aventurado, pero sin duda una mayor predictibilidad en la respuesta a la estimulación es de amplia utilidad para estos procedimientos y seguramente de mucho interés para las parejas tratadas por lo que invertir en su manejo puede ser una decisión rentable.

Es cierto que aún quedan rasgos de la potencialidad de la folitropina delta por demostrar y será en los años siguientes que la investigación en este campo refrende o refute sus ventajas frente a los esquemas convencionales.

BIBLIOGRAFIA

- Aboulghar, M. A., & Mansour, R. T. (2003). Ovarian hyperstimulation syndrome: Classifications and critical analysis of preventive measures. *Human Reproduction Update*, 9(3), 275-289.
- Abramovich, D. N., Irusta, G., & Parborell, M. F. A. (2014). Foliculogénesis. En *El óvulo como paciente*. Ascune.
- Adashi, E. Y. (1996). The ovarian follicular apparatus. *Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 18-40.
- Al-Inany, H., Aboulghar, M. A., Mansour, R. T., & Serour, G. I. (2005). Optimizing GnRH antagonist administration: Meta-analysis of fixed versus flexible protocol. *Reproductive Biomedicine Online*, 10(5), 567-570
- Anobile, C. J., Talbot, J. A., McCann, S. J., Padmanabhan, V., & Robertson, W. R. (1998). Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Molecular Human Reprod* 4(7), 631-639
- Antinori, M., Licata, E., Dani, G., Cerusico, F., Versaci, C., d'Angelo, D., & Antinori, S. (2008). Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: A prospective randomized trial. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(6), 835-841
- Arce, J.-C., Andersen, A. N., Fernández-Sánchez, M., Visnova, H., Bosch, E., García-Velasco, J. A., Barri, P., de Sutter, P., Klein, B. M., & Fauser, B. C. J. M. (2016). Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone: A randomized, antimüllerian hormone-stratified, dose-response trial in women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 102(6), 1633-1640

- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biología: La vida en la tierra*. Pearson Educación.
- Austin, C. R. (1995). *Evolution of human gametes-oocytes*. In: Grudzinskas JG, Yovich JL. (eds). *Gametes. The oocyte*. Cambridge University Press.
- Baker, V. L., Brown, M. B., Luke, B., Smith, G. W., & Ireland, J. J. (2015). Gonadotropin dose is negatively correlated with live birth rate: Analysis of more than 650,000 assisted reproductive technology cycles. *Fertility and Sterility*, 104(5), 1145-1152
- Balen, A., Platteau, P., Andersen, A. N., Devroey, P., Helmgard, L., Arce, J.-C., & Bravelle Ovulation Induction (BOI) Study Group. (2007). Highly purified FSH is as efficacious as recombinant FSH for ovulation induction in women with WHO Group II anovulatory infertility: A randomized controlled non-inferiority trial. *Human Reproduction*, 22(7), 1816-1823
- Bartoov, B., Berkovitz, A., Eltes, F., Kogosowski, A., Menezes, Y., & Barak, Y. (2002). Real-Time Fine Morphology of Motile Human Sperm Cells is Associated With IVF-ICSI Outcome. *Journal of Andrology*, 23(1), 1-8
- Benítez, E. V. (2003). *Medicina reproductiva*. El Manual Moderno.
- Berg, U., Brucker, C., & Berg, F. D. (1997). Effect of motile sperm count after swim-up on outcome of intrauterine insemination. *Fertility and Sterility*, 67(4), 747-750
- Berger, E., Chabloz, P., De Quay, N., Sann, A., Walton, S., Germond, M., & Birkhäuser, M. (1999). An open, randomized, group-comparative bi-centre study comparing recombinant FSH Follitropinum β 150 IU and highly purified urinary FSH 225 IU as a fixed dose regimen in IVF/ICSI treatment. *Hum Reprod* 14(Suppl_3), 61-62

- Bergh, C., Howles, C. M., Borg, K., Hamberger, L., Josefsson, B., Nilsson, L., & Wikland, M. (1997). Recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH; Gonal-F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): Results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Human Reproduction*, *12*(10), 2133-2139
- Berkovitz, A., Eltes, F., Lederman, H., Peer, S., Ellenbogen, A., Feldberg, B., & Bartoov, B. (2006). How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reproductive Biomedicine Online*, *12*(5), 634-638
- Berne, R., Koeppen, B., Levy, M., & Stanton, B. (2008). *Berne and Levy physiology*. (3a ed.). Mosby Elsevier.
- Bissonnette, F., Minano Masip, J., Kadoch, I.-J., Librach, C., Sampalis, J., & Yuzpe, A. (2021). Individualized ovarian stimulation for in vitro fertilization: A multicenter, open label, exploratory study with a mixed protocol of follitropin delta and highly purified human menopausal gonadotropin. *Fertility and Sterility*, *115*(4), 991-1000
- Blumenfeld, Z. (2015). Why more is less and less is more when it comes to ovarian stimulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*(12), 1713-1719
- Bosch, E., Nyboe Andersen, A., Barri, P., García-Velasco, J. A., de Sutter, P., Fernández-Sánchez, M., Visnova, H., Klein, B. M., Mannaerts, B., & Arce, J.-C. (2015). Follicular and endocrine dose responses according to anti-Müllerian hormone levels in IVF patients treated with a novel human recombinant FSH (FE 999049). *Clinical Endocrinology*, *83*(6), 902-912

- Bosch, E., Vidal, C., Labarta, E., Simon, C., Remohi, J., & Pellicer, A. (2008). Highly purified hMG versus recombinant FSH in ovarian hyperstimulation with GnRH antagonists—A randomized study. *Human Reproduction*, 23(10), 2346-2351
- Brandan, N., Llanos, I., Reyes, J., & Rodríguez, A. (2011). Hormonas hipotalámicas e hipofisarias. *Universidad Nacional del Nordeste Facultad de Medicina. Corrientes, República Argentina. 25p.*
- Butler, M., & Spearman, M. (2014). The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 107-112
- Chambers, A. E., Nayini, K. P., Mills, W. E., Lockwood, G. M., & Banerjee, S. (2011). Circulating LH/hCG receptor (LHCGR) may identify pre-treatment IVF patients at risk of OHSS and poor implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9(1), 161
- Chen, Y., Xu, X., Wang, Q., Zhang, S., Jiang, L., Zhang, C., & Ge, Z. (2015). Optimum oocyte retrieved and transfer strategy in young women with normal ovarian reserve undergoing a long treatment protocol: A retrospective cohort study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(10), 1459-1467
- Chin, E. C. (2004). Progesterone secretion by luteinizing human granulosa cells: A possible cAMP-dependent but PKA-independent mechanism involved in its regulation. *The Journal of Endocrinology*, 183(1), 51-60
- Cirne, F., Aghel, N., Petropoulos, J.-A., Klotz, L., Lenihan, D. J., Saad, F., Pinthus, J., & Leong, D. P. (2021). The cardiovascular effects on GnRH antagonists in men with prostate cancer. *European Heart Journal. Cardiovascular Pharmacotherapy*, 18(1), 91-102

- Coco-Martin, J. M., & Harmsen, M. M. (2008). A review of therapeutic protein expression by mammalian cells. *Bioprocess International*, 6(Suppl. 6), 28-33.
- Cole, L. A. (2012). hCG structure: A logical perspective. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1(4), 287-292
- Combarous, Y. (1992). Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews*. 13(4), 670-691
- Contreras Huamanyauri, F. (2019). La tecnología del ADN recombinante, Genoma humano. *Universidad Nacional de Educación Enrique Guzmán y Valle*. <http://repositorio.une.edu.pe/handle/UNE/4587>
- Crawford, E. D., Tombal, B., Keane, T., Boccardo, F., Miller, K., Shore, N., Moul, J. W., Damber, J.-E., Collette, L., & Persson, B.-E. (2018). FSH suppression and tumour control in patients with prostate cancer during androgen deprivation with a GnRH agonist or antagonist. *Scandinavian Journal of Urology*, 52(5-6), 349-357
- Crawford, E. D., Tombal, B., Miller, K., Boccon-Gibod, L., Schröder, F., Shore, N., Moul, J. W., Jensen, J.-K., Olesen, T. K., & Persson, B.-E. (2011). A phase III extension trial with a 1-arm crossover from leuprolide to degarelix: Comparison of gonadotropin-releasing hormone agonist and antagonist effect on prostate cancer. *The Journal of Urology*, 186(3), 889-897
- Croxatto, H. B., Ortiz, M. E., Diaz, M. S., Hess, R., Balmaceda, J. P., Cheviakoff, S., & Lladós, C. (1977). Normal time course of ovum transport in women. *Fertility and Sterility*, 28(3), 283-283.
- Daya, S. (2002). Updated meta-analysis of recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, 77(4), 711-714

- De Mora, F., & Fauser, B. C. J. M. (2017). Biosimilars to recombinant human FSH medicines: Comparable efficacy and safety to the original biologic. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(1), 81-86
- Debieve, F., Beerlandt, S., Hubinont, C., & Thomas, K. (2000). Gonadotropins, prolactin, inhibin A, inhibin B, and activin A in human fetal serum from midpregnancy and term pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(1), 270-274.
- Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (2004). A review of ten years experience of ICSI. *Human Reproduction Update*, 10(1), 19-28
- Díaz, J. A. Á. (2007). Historia contemporánea: Las técnicas complejas de reproducción asistida. *Ginecología y Obstetricia de México*, 11.
- Dickey, R. P., Thornton, M., Nichols, J., Marshall, D. C., Fein, S. H., Nardi, R. V., & Bravelle IVF Study Group. (2002). Comparison of the efficacy and safety of a highly purified human follicle-stimulating hormone (Bravelle) and recombinant follitropin-beta for in vitro fertilization: A prospective, randomized study. *Fertility and Sterility*, 77(6), 1202-1208
- Donini, P., Puzzuoli, D., D'Alessio, I., Lunenfeld, B., Eshkol, A., & Parlow, A. F. (1966). Purification and separation of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) from human postmenopausal gonadotrophin (HMG). II. Preparation of biological apparently pure FSH by selective binding of the LH with an anti-HGG serum and subsequent chromatography. *Acta Endocrinologica*, 52(2), 186-198.

- Drakopoulos, P., Blockeel, C., Stoop, D., Camus, M., de Vos, M., Tournaye, H., & Polyzos, N. P. (2016). Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Human Reproduction*, *31*(2), 370-376
- Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. N. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, *143*(3), 1076-1084
- Edwards, R. G., Steptoe, P. C., & Purdy, J. M. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, *87*(9), 737-756
- Eppig, J. J., Chesnel, F., Hirao, Y., O'Brien, M. J., Pendola, F. L., Watanabe, S., & Wigglesworth, K. (1997). Oocyte control of granulosa cell development: How and why. *Human Reproduction*, *12*(11 Suppl), 127-132
- Eriksen, G. V., Carlstedt, I., Ulbjerg, N., & Ernst, E. (1998). Cervical mucins affect the motility of human spermatozoa in vitro. *Fertility and Sterility*, *70*(2), 350-354
- Esparza-Pérez, R. V. (2017). La depreciación de los derechos humanos y la regulación de la reproducción humana asistida en México. *Gaceta Médica de México*, *153*(5), 626-632
- Fanchin, R., Ayoubi, J. M., Righini, C., Olivennes, F., Schönauer, L. M., & Frydman, R. (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Human Reproduction*, *16*(6), 1115-1119

- Fauser, B. C. J. M. (2017). Patient-tailored ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 108(4), 585-591
- Ferin, M. J. (1996). *The menstrual cycle: An integrate view*. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Lippincott-Raven.
- Fominaya, J. M. (2016). Vectores de transferencia en terapia génica. *Reserch Gate*, 1(1), 85-100.
- Fox, S. I. (2008). *Fundamentals of human physiology* (10a ed.). McGraw-Hill.
- Frías Iniesta, J. (2008). ¿Hay diferencias entre las gonadotropinas disponibles para la estimulación ovárica en técnicas de reproducción asistida? *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 51(5), 281-300
- Frydman, R., Howles, C. M., Truong, F., & for The French Multicentre Trialists. (2000). A double-blind, randomized study to compare recombinant human follicle stimulating hormone (FSH; Gonal-F®) with highly purified urinary FSH (Metrodin® HP) in women undergoing assisted reproductive techniques including intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 15(3), 520-525
- García Garduza, I. (2015). A propósito de los vocablos latrogénico y latropatogénico. Una reflexión. *Revista CONAMED*, 20(3), 131-136.
- Garrido Pertierra, A. (2009). *Fundamentos de bioquímica metabólica*. Edit Tébar, S. L.
- Garrido Pertierra, A., Villaverde, C., Blanco, M., Teijon, J., Mendoza, C., & Ramírez, J. (2009). *Tecnología de ADN recombinante*. En: Garrido Pertierra, A. *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. Editorial Tébar, S. L.

- Glass, R.H. (1995). *Female infertility* In: Keye, W.R.; Chang, R.J.; Rebar, R.W. *Infertility: Evaluation and Treatment*. W.B. Saunders.
- Goa, K. L., & Wagstaff, A. J. (1998). Follitropin Alpha in Infertility. *BioDrugs*, 9(3), 235-260
- González, C. O., & Serrano, A. P. S. (2010). *Tópicos selectos en endocrinología reproductiva*. Editorial Allfil.
- González-Santos, S. P. (2020). *A Portrait of Assisted Reproduction in Mexico: Scientific, Political, and Cultural Interactions*. Springer Verlag.
- Gosden, R., Clarke, H., & Millar, D. (2002). *Female gametogenesis*. In: Fauser BCJM. *Reproductive Medicine. Molecular cellular and genetics fundamentals*. Taylor & Francis.
- Grant, G. F., & Vale, W. (1974). Hypothalamic control of anterior pituitary hormone secretion—Characterized hypothalamic-hypophysiotropic peptides. *Current Topics in Experimental Endocrinology*, 2, 37-72.
- Grudzinskas, J. G., Grudzinskas, J. G., Grudzinskas, J. G., & Yovich, J. L. (1995). *Gametes—The Oocyte*. Cambridge University Press.
- Havelock, J. C., Rainey, W. E., & Carr, B. R. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228(1-2), 67-78
- Hedon, B., Out, H. J., Hugues, J. N., Camier, B., Cohen, J., Lopes, P., Zorn, J. R., van der Heijden, B., & Coelingh Bennink, H. J. (1995). Efficacy and safety of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) in infertile women pituitary-suppressed with triptorelin undergoing in-vitro fertilization: A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre trial. *Human Reproduction*, 10(12), 3102-3106

- Hillier, S. G. (2009). The ovary: From basic research to clinic. *Molecular Human Reproduction*, 15(12), 763-763
- Holesh, J. E., Bass, A. N., & Lord, M. (2021). Physiology, Ovulation. En *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Howles, C. M. (1996). Genetic engineering of human FSH (Gonal-F). *Human Reproduction Update*, 2(2), 172-191
- Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1-24
- Hudson, P. L., Dugas, I., Donahoe, P. K., Cate, R. L., Epstein, J., Pepinsky, R. B., & MacLaughlin, D. T. (1990). An immunoassay to detect human müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70(1), 16-22
- Hughes, E. G., Fedorkow, D. M., Daya, S., Sagle, M. A., Van de Koppel, P., & Collins, J. A. (1992). The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, 58(5), 888-896
- Jacob, S. W., Francone, C. A., & Lossow, W. J. (1990). Anatomía e fisiología humana. *Anatomía e fisiología humana*, 569-569.
- Ji, J., Liu, Y., Tong, X. H., Luo, L., Ma, J., & Chen, Z. (2013). The optimum number of oocytes in IVF treatment: An analysis of 2455 cycles in China. *Human Reproduction*, 28(10), 2728-2734
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., & Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428(6979), 145-150

- Kably Ambe, A., López Ortiz, C. S., Serviere Zaragoza, C., Velázquez Cornejo, G., Pérez Peña, E., Santos Haliscack, R., Luna Rojas, M., Valerio, E., Santana, H., & Gaviño Gaviño, F. (2012). Mexican National Consensus on Assisted Reproduction Treatment. *Ginecologia Y Obstetricia De Mexico*, *80*(9), 581-624.
- Knobil, E. (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Progress in Hormone Research*, *36*, 53-88
- Koechling, W., Plaksin, D., Croston, G. E., Jeppesen, J. V., Macklon, K. T., & Andersen, C. Y. (2017). Comparative pharmacology of a new recombinant FSH expressed by a human cell line. *Endocrine Connections*, *6*(5), 297-305
- La Marca, A., & Sunkara, S. K. (2014). Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: From theory to practice. *Human Reproduction Update*, *20*(1), 124-140
- Le Tissier, P., Fiordelisio Coll, T., & Mollard, P. (2018). The Processes of Anterior Pituitary Hormone Pulse Generation. *Endocrinology*, *159*(10), 3524-3535
- Leao, R. de B. F., & Esteves, S. C. (2014). Gonadotropin therapy in assisted reproduction: An evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics Sao Paulo*, *69*(4), 279-293
- Lepor, H. (2005). Comparison of single-agent androgen suppression for advanced prostate cancer. *Reviews in Urology*, *7 Suppl 5*, S3-S12.
- Leung, P. C. K., & Adashi, E. Y. (2018). *The Ovary*. Academic Press.
- Liss, J., Kunicki, M., Czyzyk, A., Pastuszek, E., Zabielska, J., Meczekalski, B., & Lukaszuk, K. (2017). Clinical utility of different anti-Müllerian hormone—AMH assays for the purpose of pregnancy prediction. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinol*, *33*(10), 791-796

- Loke, Y. W., & King, A. (1995). *Human Implantation: Cell Biology and Immunology*. Cambridge University Press.
- López-Ortiz, C. G. S. (2014). La reproducción asistida en México. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 6.7(2), 63-65.
- Low, M. J. (2011). *Neuroendocrinology*. In Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Williams textbook of endocrinology (11.º ed.). Oxford University Press, USA.
- Lunenfeld, B. (2004). Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Human Reproduction Update*, 10(6), 453-467
- McCann, S. M., Karanth, S., Mastronardi, C. A., Dees, W. L., Childs, G., Miller, B., Sower, S., & Yu, W. H. (2001). Control of Gonadotropin Secretion by Follicle-Stimulating Hormone-Releasing Factor, Luteinizing Hormone-Releasing Hormone, and Leptin. *Archives of Medical Research*, 32(6), 476-485
- McLachlan, R. I., Healy, D. L., Robertson, D. M., Burger, H. G., & de Kretser, D. M. (1987). Circulating immunoreactive inhibin in the luteal phase and early gestation of women undergoing ovulation induction. *Fertility and Sterility*, 48(6), 1001-1005
- Mercier S.M. (2016). Process analytical technology tools for perfusion cell culture. *Engineering Life Science*, 16, 25-35
- Milki, A. A., Hinckley, M. D., & Behr, B. (2000). Three is a crowd with blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73(4), S15
- Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. (2003). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders.
- Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science*, 260(5110), 926-932

- Niswender, G. D. (2003). Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123(3), 333-339
- Nyboe Andersen, A., Nelson, S. M., Fauser, B. C. J. M., García-Velasco, J. A., Klein, B. M., Arce, J.-C., & ESTHER-1 study group. (2017). Individualized versus conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization: A multicenter, randomized, controlled, assessor-blinded, phase 3 noninferiority trial. *Fertility and Sterility*, 107(2), 387-396
- Olsson, H., Sandström, R., & Grundemar, L. (2014). Different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) derived from a human cell line compared with rFSH from a non-human cell line. *Journal of Clinical Pharmacology*, 54(11), 1299-1307
- Organization, W. H. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. World Health Organization.
- Out, H. J., Mannaerts, B. M., Driessen, S. G., & Bennink, H. J. (1995). A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 10(10), 2534-2540
- Peña, E. P. (2019). *Atención integral de la infertilidad: Endocrinología, cirugía y reproducción asistida*. Editorial Médica Panamericana
- Pokorska-Bocci, A., Stewart, A., Sagoo, G. S., Hall, A., Kroese, M., & Burton, H. (2014). «Personalized medicine»: What's in a name? *Personalized Medicine*, 11(2), 197-210
- Polyzos, N. P., & Sunkara, S. K. (2015). Sub-optimal responders following controlled ovarian stimulation: An overlooked group? *Human Reproduction*, 30(9), 2005-2008

- Pons, M. C., de los Santos, M. J., Múgica, A., Vilches, M. Á., Arroyo, G., González, B., Moragas, M., García-Cerrudo, E., Figueroa, M. J., Prados, F., Busquets, A., & Hurtado de Mendoza, M. V. (2014). Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR: Estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR de valoración morfológica de embriones tempranos en día +3 y su asociación con la tasa de nacido vivo. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 1(2), 50-55
- Popovic-Todorovic, B., Loft, A., Bredkjaer, H. E., Bangsbøll, S., Nielsen, I. K., & Andersen, A. N. (2003). A prospective randomized clinical trial comparing an individual dose of recombinant FSH based on predictive factors versus a «standard» dose of 150 IU/day in «standard» patients undergoing IVF/ICSI treatment. *Human Reproduction*, 18(11), 2275-2282
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2008). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*, 90(5 Suppl), S60
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama. (2008). Gonadotropin preparations: Past, present, and future perspectives. *Fertility and Sterility*, 90(5 Suppl), S13-20
- Rebar, R. W. (1995). *The normal menstrual cycle*. In: Keye WR, Chang RJ., Rebar, R.W. *Infertility evaluation and treatment*. W.B. Saunders.
- Ross, D., Brown, T., Harper, R., Pamarthi, M., Nixon, J., Bromirski, J., Li, C.-M., Ghali, R., Xie, H., Medvedeff, G., Li, H., Scuderi, P., Arora, V., Hunt, J., & Barnett, T. (2012). Production and characterization of a novel human recombinant alpha-1-antitrypsin in PER.C6 cells. *Journal of Biotechnology*, 162(2-3), 262-273
- Sadler, T. W., & Langman, J. (2016). *Embriología médica* (13a ed.). Panamericana.

- Salvatori, A., & Manfredi, T. (2019). Job polarisation and the middle class: New evidence on the changing relationship between skill levels and household income levels from 18 OECD countries. *Organización Para La Cooperación y Desarrollo Económicos*
- Sandström, R., Olsson, H., & Grundemar, L. (2013). Different pharmacokinetic properties between a novel recombinant FSH (FE 999049) derived from a human cell line and follitropin alfa. *Human Reproduction*, 28(suppl_1), 187-198.
- Santos-González, J. (2003). *La reproducción y sus trastornos básicos como problemas de salud*. En: Vázquez-Benítez E. *Medicina Reproductiva*. El Manual Moderno.
- Sealfon, S. C., Weinstein, H., & Millar, R. P. (1997). Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine Reviews*, 18(2), 180-205
- Seifer, D., & Tal, R. (2016). *Anti-Müllerian hormone: Biology, role in ovarian function and clinical significance*. Nova Science Publishers, Inc.
- Shavit, T., Shalom-Paz, E., Samara, N., Aslih, N., Michaeli, M., & Ellenbogen, A. (2016). Comparison between stimulation with highly purified hMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF with GnRH antagonist protocol. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 32(8), 629-633
- Shoham, Z., & Insler, V. (1998). Recombinant Technique and Gonadotropins Production: New Era in Reproductive Medicine. *Fertil and Steril*, 69(3, Supplement 2), 3S-15S
- Simerly, C. (1995). *Cytoskeletal organization and dynamics in mammalian oocytes during fertilization and maturation*. In: Grudzinskas JG, Yovich JL. (eds). *Gametes. The oocyte*. Cambridge University Press.

- Sims, J. A., & Gibbons, W. E. (1996). Treatment of human infertility: The cervical and uterine factors. *Reproductive endocrinology, surgery and technology. Lippincott-Raven, New York*, 2142-2169.
- Smitz, J., Wolfenson, C., Chappel, S., & Ruman, J. (2016). Follicle-Stimulating Hormone: A Review of Form and Function in the Treatment of Infertility. *Reproductive Sciences*, 23(6), 706-716
- Speroff, L., & Fritz, M. A. (2005). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Stanger, J. D., & Yovich, J. L. (2013). Follicle recruitment determines IVF productivity rate via the number of embryos frozen and subsequent transfers. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(3), 286-296
- Steward, R. G., Lan, L., Shah, A. A., Yeh, J. S., Price, T. M., Goldfarb, J. M., & Muasher, S. J. (2014). Oocyte number as a predictor for ovarian hyperstimulation syndrome and live birth: An analysis of 256,381 in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility*, 101(4), 967-973
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463-466
- Sunkara, S. K., Rittenberg, V., Raine-Fenning, N., Bhattacharya, S. & Coomarasamy, A. (2011). Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles. *Human Reproduction*, 26(7), 1768-1774
- Thomas, C. M. G., Span, P. N., Smeenk, J. M. J., Hanssen, R. G. J. M., Braat, D. D. M., & Sweep, F. C. G. J. (2009). Occurrence of postmenopausal-like acidic follicle-stimulating hormone (FSH) isoforms precedes the rise of FSH before menopause. *Fertility and Sterility*, 92(2), 613-619

- Tilly, J. L., & Telfer, E. E. (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: A step closer towards control of the female biological clock? *Molecular Human Reproduction*, *15*(7), 393-398
- Ulloa-Aguirre, A., Cravioto, A., Damián-Matsumura, P., Jiménez, M., Zambrano, E., & Díaz-Sánchez, V. (1992). Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Human Reproduction*, *7*(1), 23-30
- Ulloa-Aguirre, A., Maldonado, A., Damián-Matsumura, P., & Timossi, C. (2001). Endocrine Regulation of Gonadotropin Glycosylation. *Archives of Medical Research*, *32*(6), 520-532
- Ulloa-Aguirre, A., & Timossi, C. (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update*, *4*(3), 260-283
- Ulloa-Aguirre, A., & Timossi, C. (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive Biomedicine Online*, *1*(2), 48-62
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Barrios-de-Tomasi, J., Maldonado, A., & Nayudu, P. (2003). Impact of carbohydrate heterogeneity in function of follicle-stimulating hormone: Studies derived from in vitro and in vivo models. *Biology of Reproduction*, *69*(2), 379-389
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., & Méndez, J. P. (2001). Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gonadotrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. A matter of fact. *Human Reproduction*, *16*(4), 599-604

- Vanderzwalmen, P., Hiemer, A., Rubner, P., Bach, M., Neyer, A., Stecher, A., Uher, P., Zintz, M., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S., Cassuto, G., & Zech, N. H. (2008). Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod BioMed Online*, 17(5), 617-627
- Verhoeve, H. R., van der Veen, F., & Mol, B. W. (2006). Diagnostic tests in reproductive medicine. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice*, 6(1), 20-25
- Villanueva Díaz, C., Suárez Juárez, M., Díaz, M. A., & Ayala Ruiz, A. (1989). Impact of sperm capacitation on various populations of human spermatozoa. *Ginecología Y Obstetricia De Mexico*, 57, 52-55.
- Vite Vargas, J. A., Ortiz Núñez, D. A., Hernández Marín, I., Tovar Rodríguez, J. M., & Ayala, A. R. (2005). [Epidemiological analysis of infertility in a Mexican population]. *Ginecología Y Obstetricia De Mexico*, 73(7), 360-364.
- Vitt, U. A., Kloosterboer, H. J., Rose, U. M., Mulders, J. W. M., Kiesel, P. S., Bete, S., & Nayudu, P. L. (1998). Isoforms of Human Recombinant Follicle-Stimulating Hormone: Comparison of Effects on Murine Follicle Development In Vitro¹. *Biology of Reproduction*, 59(4), 854-861
- Wely, M. van, Kwan, I., Burt, A. L., Thomas, J., Vail, A., Veen, F. V. der, & Al-Inany, H. G. (2011). Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2
- Zhu, X., & Fu, Y. (2019). Evaluation of Ovarian Stimulation Initiated from the Late Follicular Phase Using Human Menopausal Gonadotropin Alone in Normal-Ovulatory Women for Treatment of Infertility: A Retrospective Cohort Study. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 448