



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DE LA SUPEROVULACIÓN SOBRE LA  
FUNCIONALIDAD ENDOMETRIAL EN EL RATÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**NATALY RODRÍGUEZ GÓMEZ**



**DIRECTOR DE TESIS  
DR. OMAR COLLAZO NAVARRETE**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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.

**1. Datos alumna**

Rodríguez  
Gómez  
Nataly  
5545857570  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310297862

**2. Datos del tutor**

Dr.  
Omar  
Collazo  
Navarrete

**3. Datos del sinodal 1**

Dr.  
Leandro David  
Hernández  
García

**4. Datos del sinodal 2**

Dr.  
Edgar Ricardo  
Vázquez  
Martínez

**5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
Rosario  
Ortíz  
Hernández

**6. Datos del sinodal 4**

M. en C.  
Tanya Marcela  
González  
Martínez

**7. Datos del trabajo escrito**

Efecto de la superovulación sobre la funcionalidad endometrial en el ratón.  
63 p.  
2021

“I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician, he is also a child place before natural phenomenon, which impress him like a fairy tale.”

— Marie Curie



## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A la Facultad de Ciencias por todos los momentos vividos, por las enseñanzas tanto académicas como personales, por permitirme conocer a personas que comparten la misma pasión por la vida y sus seres, por el universo y por las ciencias que los estudian.

Al Dr. Daniel Garzón, por permitirme realizar mi tesis en la Unidad de Modelos Biológicos y por siempre estar dispuesto a darme los recursos necesarios para poder realizarla.

Al Doctor Omar Collazo, mi asesor de tesis, por ser mi sensei durante estos últimos años. Llegué como una niña al laboratorio, sabiendo poco pero con mucha hambre de aprender y tú me recibiste siempre con la mejor disposición. Me enseñaste cual hermano mayor, explicándome cuando podías y cuando no, alentándome a investigarlo. Con el paso del tiempo y las experiencias vividas me he dado cuenta de que en muy pocos lugares te reciben de la manera en que tú lo hiciste conmigo y te agradezco muchísimo por eso.

A Gilda Guerrero, porque sin beneficio alguno dedicaste parte de tu tiempo a echarle un ojo a este trabajo, a corregirme y a ayudarme a mejorarlo.

A todo mi comité sinodal, gracias por sus valiosas correcciones, por ser tan amables y cálidos en sus comentarios y por su tiempo y dedicación para hacerme ver detallitos que no hubiera notado sin su ayuda.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Soy un conjunto de mis experiencias vividas y de lo aprendido de ellas, gran parte de éstas las he construido junto a personas cuya esencia he encontrado única y verdaderamente especial. En estas líneas intentaré expresar en resumidas palabras mi más grande gratitud a todas aquellas personas que me han motivado, me han ayudado y/o me han inspirado.

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres, Rosa María y Germán, por todo su amor y por todo su esfuerzo:

Má, gracias por todo el apoyo que me has dado durante toda mi vida, por ser la primera persona que apuesta por mí y que cree en mí, porque sea cual sea mi sueño o mis ideas, siempre me motiva a seguir las y me ayudas en lo que puedas. Gracias por ser mi mayor modelo de resiliencia y de mujer fuerte, te amo y te admiro mucho Rosqui.

Pá, gracias por el gran esfuerzo que hiciste para que yo pudiese estudiar una carrera y seguir mi sueño, es gracias a ti que el amor y la curiosidad por aprender de la vida me siguen desde pequeña,

eres sin duda una de mis mayores inspiraciones. En donde quiera que se encuentre tu alma, te amo y te admiro siempre Ger.

Con todo mi amor agradezco profundamente a mi familia y especialmente a mis hermanas, hermanos y cuñado, Fabiola, Fabián, Nayeta, Arge, Mariela, Maribel, Ger, Axelín y Francisco, por su amor y cariño incondicional, por creer en mí, por regalarme de su valioso tiempo para escucharme y aconsejarme, por apoyarme en mis sueños y ayudarme a cumplirlos, gracias sobre todo por esas reuniones de exceso de risa, comida y música que me reinician la vida. Ojalá todas las personas tuviesen tanto apoyo como el que ustedes me han brindado.

A mis amigos Dieguito, Keni, Nan, Chaps, Nadia y a todos aquellos que me han acompañado durante la mitad de mi vida, ustedes saben quiénes son, porque a pesar de todos sus deberes de la vida adulta siempre hay un “¿Cómo estás?” para mí. Gracias por todos los momentos tan cálidos que hemos compartido.

A Migue, mi compañero, por ser el árbol en donde se apoya esta viajera para descansar y tomar un respiro para seguir, mi curita, mi cobija calentita. Tú más que nadie sabes el gran esfuerzo que implicó la realización de este trabajo. Gracias por el apoyo que siempre me brindas, por hacer un gran equipo conmigo, por ser tan comprensivo, por compartir conmigo esos viajes sanadores, por las noches de doritos y papitas, refrescos y canciones que me hacen olvidar todo. A cualquier parte, contigo siempre.

A mis amigos de la carrera, Óscar, Chuchito, Aarón y Emmanuel, agradezco tanto a la vida por permitirme navegar las aguas de la Biología junto a ustedes. Gracias por esas salidas a campo épicas, por el estudio en grupo y por las fiestas inolvidables, la Facultad no hubiese sido lo mismo sin su compañía.

A mis peluditos, Tobías y Elio, porque su compañía fue clave mientras realizaba este escrito. Nadie con ese amor incondicional como el de estos dos. Quiera la vida que sigamos amándonos de cerquita por muchos años más.

A Karls, mi hermana de tesis. Compartimos días casi enteros en el laboratorio, nos maravillamos juntas en esos microscopios, morimos de cansancio y creímos que nunca llegaría el momento de titularnos, henos aquí. Gracias por ser una compañera y amiga en toda la extensión de la palabra.

A Axel Cabeza, por hacerme sentir que, aunque tuviese mi familia lejos tenía un hermanito Biólogo cerca, por ser completamente transparente conmigo y permitirme serlo contigo, después de todo no somos tan diferentes.

A Dylann y a Caribú, por ser indiscutiblemente los pasos a un nuevo camino lleno de hambre por conocer todo, por abrirme los ojos y el alma para atrapar lo que se me pusiera enfrente y aprender de ello. Mau, gracias por tantas pláticas enriquecedoras y por los cafés calentitos mientras ponías a mi mente a imaginar en mil porqués... De todo.

A todos los profesores con los que he tomado clases a lo largo de mi vida, sobre todo a ustedes porque han dejado huella en mi ser:

A la profesora Araceli del preescolar, por enseñarle siempre a todos sus alumnitos con cariño y paciencia. A los profesores Reséndiz (q.e.p.d.) y Espiricueta, de la primaria y secundaria respectivamente, por inculcarme el amor por la lectura. Al profesor Pedro Hernández (q.e.p.d.) de la preparatoria, por ser parte de mi decisión de estudiar Biología con sus clases tan divertidas e interesantes sobre la salud humana y por siempre ser un ser humano magnífico y cálido conmigo. Al profesor Bencomo de la prepa, por sus clases que eran más bien un lugar para echar la imaginación a volar con esa voz que nos leía a todos los poemas más maravillosos que alguna vez escuché. A todos los profesores que me dieron clases en la Facultad de Ciencias, sobre todo a la Mtra. Tanya González, a la Dra. Itzel Sigala y al Dr. Roberto Lupo, por sus clases tan alimentadoras, por permitirme reafirmar que me encontraba en el camino correcto de la ciencia, por hacerme amar más mi carrera y motivarme a leer e investigar más después de escucharlos ¡Cuánta vocación y talento! Mi más grande admiración.

A Rubí, a Gabi y a Filipino, mis compitas MVZ favoritos, por hacer mi estancia en el LaNReGen bien divertida y amena, por tantas pláticas y risas.

Me es imposible nombrar a todas las personas que he conocido durante todo este camino y que me han marcado de alguna u otra manera, sin embargo, espero haberles hecho saber en su momento la importancia de su presencia en mi vida, SOY VERDADERAMENTE AFORTUNADA.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1.1 Fisiología de la reproducción.....	3
1.1.1 Biología de los gametos en mamíferos .....	3
1.1.2 Ciclo estral .....	6
1.1.3 Ciclo menstrual .....	8
1.1.4 Fecundación .....	12
1.1.5 Implantación del blastocisto y decidualización .....	15
1.2 Problemas de la reproducción.....	20
1.2.1 Problemas de la reproducción asociados al endometrio .....	21
1.3 Estrategias para la reproducción asistida .....	22
1.4 Superovulación.....	25
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>25</b>
2.1 La superovulación y la función endometrial.....	26
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>34</b>
5.1 Objetivos particulares.....	34
<b>6. MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>34</b>
<b>6.1 Animales.....</b>	<b>34</b>
6.2 Citologías .....	34
6.3 Superovulación.....	35
6.4 Grupos experimentales .....	35
6.5 Obtención de cigotos y cultivo .....	35
6.6 Visualización de los sitios de implantación del embrión.....	37
6.7 Contabilización del número de crías.....	38
6.8 Análisis estadístico .....	38
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
7.1 La superovulación no afecta a mediano plazo al número de embriones obtenidos ni al desarrollo temprano de éstos .....	38

7.2 La superovulación no afecta a mediano plazo al número de sitios de implantación observados en el endometrio .....	43
7.3 La superovulación afecta negativamente a mediano plazo al número de crías obtenidas .....	47
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
8.1 Número de embriones recuperados y desarrollo embrionario pre-implantatorio .....	49
8.2 Número de sitios de implantación.....	50
8.3 Número de crías.....	52
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

Existen múltiples problemas causantes de la infertilidad femenina, debido a esto las técnicas de reproducción asistida (TRA) han sido un camino alternativo para solventarlo. Sin embargo, el fracaso en la implantación del embrión, uno de los principales obstáculos para llevar una gestación exitosa, sigue sin poder resolverse del todo. El endometrio es la capa mucosa del útero cuya función principal es la implantación del embrión y consta de dos capas principales, una funcional y otra basal. La capa funcional prolifera en cada ciclo y en su superficie aumenta la presencia de glicoproteínas para que la implantación se lleve a cabo, y la capa basal regenera la capa funcional después de que ésta degenera, las alteraciones en alguna de ellas pueden ser uno de los factores causantes de una implantación fallida. Algunos estudios en humanos han demostrado que la administración de hormonas exógenas durante las TRA tiene un impacto negativo sobre la función endometrial. Desafortunadamente, existen pocos modelos experimentales que permitan determinar los factores que coordinan la implantación y cómo es que estos pueden verse desregulados. Los modelos existentes han mostrado resultados a corto plazo, por lo que aún se desconoce si dichas alteraciones afectan a mediano o a largo plazo la función endometrial. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la superovulación (SO) a corto y mediano plazo sobre la funcionalidad endometrial en ratones de la línea C57BL/6, estandarizada genéticamente. Para evaluar los efectos a corto plazo indujimos la SO en un grupo de hembras durante el proestro y las pusimos a cruce inmediata, por otro lado, para evaluar los efectos a mediano plazo indujimos la SO en un grupo de hembras durante el proestro y las pusimos a cruce una semana después; dividimos ambos grupos en grupos más pequeños para contabilizar el número de embriones obtenidos por hembra, el número de embriones que lograron desarrollarse a la siguiente etapa embrionaria, el número de sitios de implantación que observamos en cada hembra y el número de crías que tuvo cada hembra. Observamos que la SO afecta positivamente a corto plazo al número de embriones obtenidos, encontrando aún más del doble de éstos respecto a las hembras control y que no afecta a mediano plazo al número de embriones obtenidos. Observamos también que la SO no afecta el desarrollo temprano a corto ni a mediano plazos, pero incide positivamente en el número de sitios de implantación a corto plazo, encontrándose más del doble respecto al grupo control, además de que no se ven afectados a mediano plazo. Por último, registramos que la SO tiene un efecto positivo a corto plazo duplicando el número de crías obtenidas con respecto al grupo control; sin embargo, registramos el efecto

opuesto en el tratamiento a mediano plazo, en donde se redujo considerablemente el número de crías.

Se requiere aumentar el tamaño de la muestra y sobre todo realizar más estudios para determinar contundentemente los efectos de la superovulación a mediano plazo y los mecanismos que estos conllevan.

Palabras clave: Implantación, endometrio, superovulación, infertilidad, ciclo estral, ciclo menstrual.

### **ABSTRACT**

There exist multiple problems that can cause feminine infertility; therefore, assistive reproductive technology (ART) has been an alternate solution option. However, due to failures with embryo implantation, which is one of the principal ways of achieving successful gestation, a continuous successful solution has not been achievable. The endometrium is the mucous layer of the uterus, which its mainly function is the implantation of the embryo; and consists of the functional and base layers. The functional layer proliferates every cycle and, on its surface, increases the presence of glycoproteins to allow for implantation, while the base layer regenerates the functional layer degeneration. The alterations in one of these layers may be one of the factors as to why implantations may fail. Some human studies have demonstrated that the administration of exogenous hormones during ART have had a negative effect on the endometrial function. Unfortunately, few experimental models exist which demonstrate the factors that coordinate the implantation and how these may appear unregulated. The existing models have demonstrated short term results, for which it is still unknown whether such alterations may have short- or long-term effects on the endometrial function. The current study had the objective of evaluating the short- and long-term effects superovulation (SO) may have over the endometrial functionality in the genetically standardized rats from the C57BL/6 line. To evaluate the effects in a short-term period SO was induced in a group of females during the proestrous phase and were put into immediate mating. On the other hand, to evaluate the effects in a medium-term period SO was induced in a group of females during the proestrous phase and were put into mating a week later; we divide both groups into smaller groups to count the number of embryos per female, the number of embryos developed, the number of implantation sites per female and the number of puppies per female. We observed that SO positively affect the number of eggs produced during ovulation over a short-term period, which led to discovering that the females in the

control group were able to produce more than double and does not affect the number of eggs obtained during ovulation over a medium-term period. It was also observed that SO did not cause early development in the females in a short or medium period but did positively affect the number of implantation sites over a short term, which lead to more than double in the control group being affected without seeing effects lasting for longer than medium periods of time. Lastly, we documented that SO has a positive effect in producing double the amount of offspring over a short period of time with respect to the control group; however, it was observed that the opposite effect was produced at medium periods of time where the number of offspring was reduced. It is necessary to increase the amount of evidence, and above all, conduct more studies to determine without a doubt the effects that superovulation may produce over a medium timeframe and the mechanisms associated with it.

Keywords: Implantation, endometrium, superovulation, infertility, oestrous cycle, menstrual cycle.

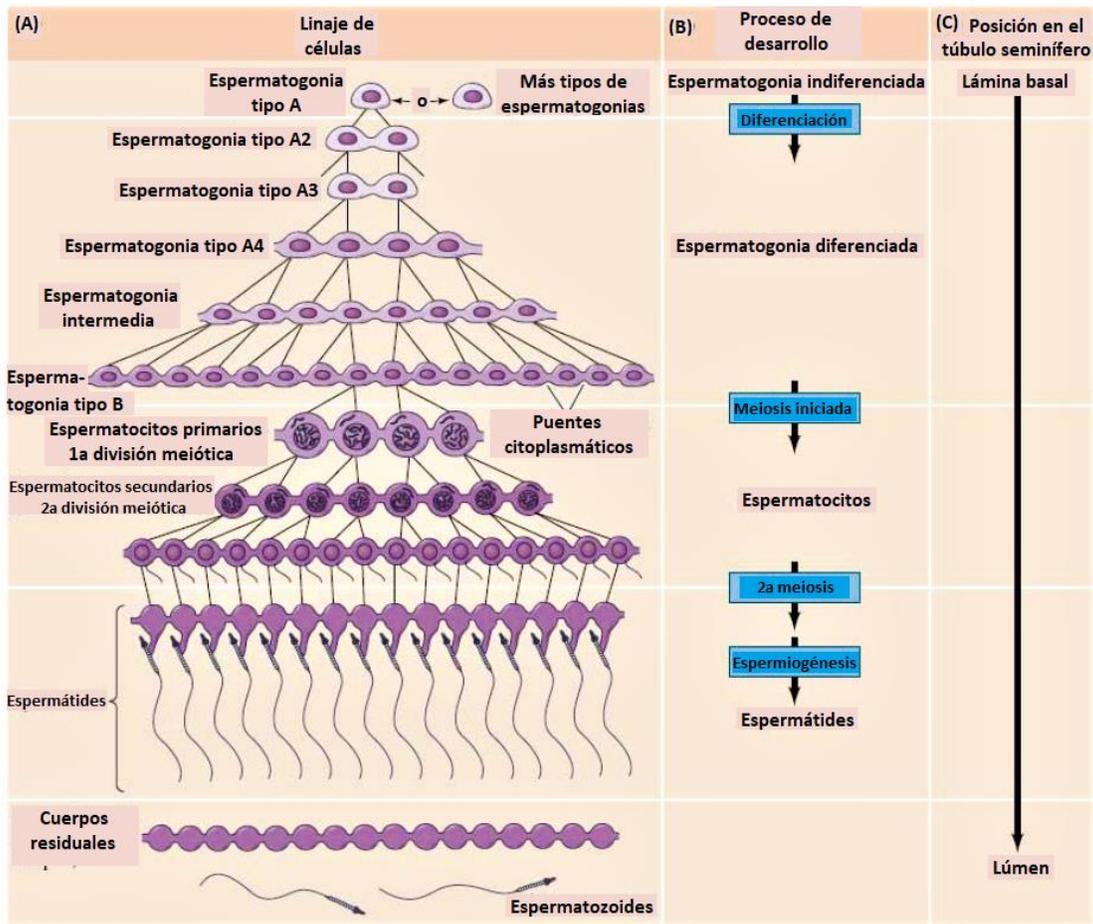
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Fisiología de la reproducción

La reproducción en mamíferos tiene como objetivo la formación de un nuevo individuo, cuyo material genético será el resultado de la suma de cromosomas maternos y paternos (mitad y mitad) mediante la fecundación, que es el proceso en el cual el gameto femenino (el óvulo) y el gameto masculino (el espermatozoide) se fusionan, formando así al cigoto, la primera célula diploide del nuevo individuo. La reproducción sexual produce variación genética, la cual es esencial para que opere la selección natural (University of California Museum of Paleontology & National Center for Science Education, 2014).

#### 1.1.1 Biología de los gametos en mamíferos

Los precursores celulares de los gametos son denominados células germinales primordiales (CGPs), en el desarrollo embrionario temprano éstas migran de la región posterior del epiblasto a la gónada bipotencial o indiferenciada y son rodeadas por los cordones sexuales (Bendel-Stenzel *et al.* 1998, Gilbert, 2019). En los fetos masculinos, XY, estos cordones se transforman en cordones testiculares y las CGPs proliferan por mitosis. Al llegar a la madurez sexual estas células comienzan la espermatogénesis (Fig. 1) diferenciándose a espermatogonias, que son células redondeadas con un núcleo grande y de citoplasma homogéneo. En ratones, la progresión de CGPs a espermatozoides dura 34.5 días, mientras que en humanos toma 65 días (Johnson, 2013).



**Figura 1. Descripción general de la espermatogénesis.** (A) Formación de clones sinciciales de las células germinales en los mamíferos machos. (B) Principales tipos celulares durante la espermatogénesis y eventos que ocurren durante el proceso de diferenciación. (C) La flecha indica el desplazamiento de las células desde la lámina basal del túbulo seminífero hacia la luz a medida que avanza el desarrollo (tomada de Bloom y Fawcett, 1975).

Se distinguen diferentes tipos de espermatogonias dependiendo del aspecto de su núcleo, las primeras son las del tipo A, que representan la población de células troncales. Estas células se dividen asimétricamente por mitosis para dar lugar a otras espermatogonias del mismo tipo, o bien, a un tipo de célula que, a través de divisiones mitóticas, da lugar a espermatogonias A alargadas, A oscuras o A pálidas; estas últimas pueden formar otras células de su mismo tipo, sufrir apoptosis o diferenciarse a espermatogonia intermedia (Gilbert, 2019). Las espermatogonias intermedias forman espermatogonias tipo B, que son las células precursoras de los espermatocitos primarios y las últimas células de la línea que

se dividirán por mitosis, ya que los siguientes tipos celulares entrarán en meiosis; en ratones puede haber hasta 16 espermatogonias tipo B unidas, mientras que en humanos estas uniones se limitan aproximadamente a cuatro células (Gilbert, 2019). La transición de éstas a espermatocitos primarios está mediada por el factor neurotrófico derivado de células gliales (*glial cell-derived neurotrophic factor*: GDNF) que es, a su vez, regulado por la hormona folículo estimulante (*follicle-stimulating hormone*: FSH). Al experimentar la primera división meiótica se producen espermatocitos secundarios, éstos completan la segunda división meiótica y, como resultado, se forman células haploides llamadas espermátides, células redondeadas sin flagelo. Hasta esta etapa de la transición celular la citocinesis no se completa, por lo que se forma un sincicio que permite la comunicación citoplasmática hasta que las espermátides se diferencian a espermatozoides; entonces inicia la siguiente etapa de la maduración del gameto, llamada espermiogénesis. Durante este proceso ocurren cambios importantes en la célula, entre ellos están la reducción progresiva del tamaño de su núcleo y la condensación de su material cromosómico. Además, su citoplasma se reorganiza completamente, el aparato de Golgi se condensa en el extremo apical del núcleo y sintetiza las enzimas que formarán el acrosoma, una estructura muy importante para que el espermatozoide pueda llevar a cabo la fecundación. Posteriormente, el aparato de Golgi rodea el núcleo condensado y se convierte en la membrana o capa acrosomal, en el extremo opuesto del núcleo crece un flagelo y la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide se divide en varios dominios moleculares (Carlson, 2013; Johnson, 2013).

En los fetos femeninos, con dos cromosomas XX, las CGPs migran hacia las gónadas indiferenciadas y después de una serie de eventos mitóticos se diferencian a ovogonias. En ratones, es aproximadamente a los 13.5 días después del coito (dpc) y a las 4 semanas antes del nacimiento en los humanos, cuando las CGPs dejan de proliferar y entran en la primera división meiótica de la profase, diferenciándose en ovocitos primarios. Esta división meiótica se detiene en el diploteno de la profase y no se reanuda sino hasta que ocurre la ovulación (Plant y Zeleznik, 2015; Gilbert, 2019). Durante el nacimiento y alrededor de este evento, la mayoría de los ovocitos primarios mueren, por lo que las mujeres y las hembras de ratón tendrán un número finito de ovocitos primarios dentro de sus ovarios (Gilbert, 2019).

### 1.1.2 Ciclo estral

La mayoría de las hembras en los mamíferos presentan un periodo ovulatorio llamado ciclo estral, éste se define como el tiempo transcurrido entre un periodo de celo (periodo de receptividad sexual) y el inicio del siguiente (De Costa *et al.* 1993). Dicho ciclo está determinado por la regulación de los niveles en sangre de varias hormonas, la cual puede verse alterada por factores ambientales como el fotoperiodo, la temperatura y la alimentación. El ciclo inicia cuando el hipotálamo libera la hormona liberadora de gonadotropinas (*gonadotropin-releasing hormone*: GnRH), que a su vez estimula a la hipófisis anterior a liberar gonadotropinas, como la hormona folículo estimulante (*follicle-stimulating hormone*: FSH) y la hormona luteinizante (*luteinizing hormone*: LH), que estimulan a las células del folículo ovárico a secretar estrógenos, además de inducir la foliculogénesis y la ovulación (Gilbert, 2019). En los ratones el ciclo estral dura de 4 a 6 días, aproximadamente (Vargas *et al.* 2018), y ocurre continuamente a lo largo del año, por lo que se les denomina hembras poliéstricas continuas. El ciclo consta de dos fases, una fase folicular o estrogénica que se divide en dos etapas proestro y estro, y la fase luteínica, dividida en metaestro y diestro (Caravaca *et al.* 2005) (Fig. 2)

El proestro es la primera etapa del ciclo estral y dura aproximadamente 16 h. En ella la FSH estimula a los folículos ováricos para su crecimiento y maduración; estos folículos están constituidos por una capa simple de células granulosas epiteliales y una capa de células tecales mesenquimales. Mientras el ovocito crece, aumenta el número de células de la granulosa, formando varias capas de éstas alrededor del ovocito. Durante el crecimiento del folículo se forma una cavidad que se encuentra llena de proteínas, hormonas y otras moléculas que nutrirán al ovocito en crecimiento; a su vez, el ovocito secreta factores paracrinos que estimulan la proliferación de células foliculares, las cuales secretan factores de crecimiento y diferenciación que atraen vasos sanguíneos hacia esta región, permitiendo que se distribuya un mayor número de nutrientes hacia el ovocito. Al crecer los folículos también aumenta su producción de estrógenos y, como consecuencia, el útero se engrosa, se vasculariza más y su contenido de agua aumenta, las glándulas endometriales se hipertrofian y el moco cervical adelgaza para permitir el paso de los espermatozoides; además, las células de la mucosa vaginal sufren mitosis continuas resultando en numerosas células epiteliales nucleadas, aunadas a una disminución importante en el número de leucocitos (Gilbert, 2019).

La siguiente etapa se denomina estro, de aproximadamente 20 h, durante la cual la hembra se encuentra receptiva al macho. Las células epiteliales alcanzan su máximo desarrollo y degeneran, transformándose así en células cornificadas. El útero se encuentra sumamente vascularizado, los niveles de estrógenos son tan altos que, mediante una retroalimentación negativa, causan en la hipófisis la inhibición de la liberación de FSH (Gilbert, 2019). Los niveles de LH aumentan y debido a un pico en su concentración provocan que los folículos que alcanzaron el estadio de maduración se rompan y liberen a los ovocitos (Gilbert, 2019; Matorras *et al.* 2008). Justo antes de ser ovulados, gracias al pico de LH, el arresto meiótico en diploteno de la profase I en la que se encontraban los ovocitos primarios termina, las membranas nucleares de estas células se rompen y los cromosomas se alinean en la placa metafásica para continuar con la división celular (Johnson, 2013). Mientras tanto, las células de la granulosa de cada folículo se transforman en cuerpo lúteo por acción de la LH (Gilbert, 2019; Matorras *et al.* 2008).

Después, durante el metaestro, que dura aproximadamente 10 h, los cuerpos lúteos crecen y secretan niveles elevados de progesterona; la mucosa vaginal entra en regresión llenándose nuevamente de leucocitos y pueden encontrarse aún algunas células cornificadas. El epitelio uterino continúa en degeneración, disminuye su vascularización y su tamaño y, a diferencia del ciclo menstrual, el endometrio no se desprende, sólo se reabsorbe (Sadler, 2012).

La última etapa del ciclo se denomina diestro, ésta es la fase más larga del ciclo estral ya que dura aproximadamente 2 días y medio. En esta fase no hay actividad sexual, si no ha habido fecundación ocurre una regresión del *corpus luteum* o cuerpo lúteo, convirtiéndose en una masa de tejido cicatrizal fibroso llamada *corpus albicans* o cuerpo blanco (Sadler, 2012), con la consecuente disminución de los niveles de estrógeno y progesterona. El útero se vuelve pequeño y poco contráctil, en el estroma se encuentran leucocitos polimorfonucleares y la mucosa uterina está formada por células columnares; además, las glándulas endometriales se encuentran atróficas. Si se realiza un frotis, podrán observarse numerosos leucocitos en el epitelio vaginal y, hacia la fase final de esta etapa, células epiteliales nucleadas. En las hembras poliéstricas continuas, como el caso del ratón, el proestro vendrá después del diestro para volver a iniciar el ciclo (De Costa *et al.* 1993; Hill *et al.* 2004; Caravaca *et al.* 2005).

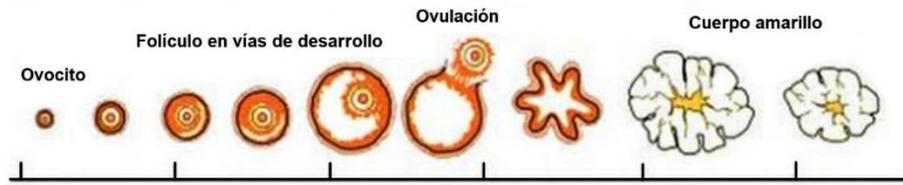
### 1.1.3 Ciclo menstrual

En los humanos el ciclo que corresponde a la maduración y liberación de los gametos femeninos, así como la preparación del útero para un posible embarazo, ocurre aproximadamente cada 29.5 días (Gilbert, 2019), con una variación de entre 21 y 42 días (Hill *et al.* 2004), y es denominado ciclo menstrual, debido a que en éste ocurre cada mes un desprendimiento de tejido endotelial desde el útero y hay sangrado. El ciclo menstrual está compuesto en realidad por el ciclo ovárico, que consta del crecimiento, maduración y liberación del ovocito, el ciclo uterino en el cual se prepara el útero para recibir al blastocisto y permitir su correcto desarrollo en caso de que se haya llevado a cabo la fecundación y el ciclo cervical, que consiste en la preparación del cérvix para permitir el paso de los espermatozoides a la llegada de éstos al tracto reproductivo (Gilbert, 2019).

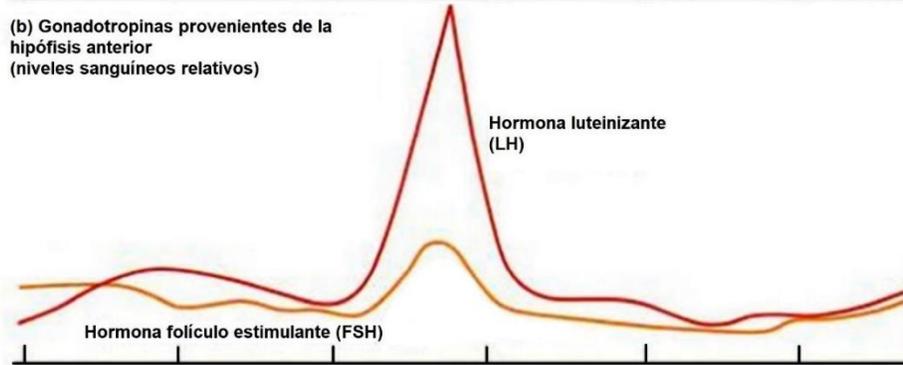
En la primera parte del ciclo menstrual, denominada fase folicular o proliferativa, la hipófisis secreta grandes cantidades de FSH para estimular el desarrollo folicular (Fig. 2); durante esta etapa, en el ovario humano se forman de 15 a 20 folículos de los cuales, normalmente, sólo uno logra llegar a la etapa máxima de crecimiento y maduración folicular (folículo dominante), mientras que los demás mueren. Si por alguna razón el folículo dominante sufre alguna alteración, ningún otro folículo podría sustituirlo (Drucker, 2006). El folículo dominante experimenta un crecimiento preovulatorio en donde desarrolla receptores de LH en sus células de la granulosa y, en respuesta al aumento de los niveles de esta hormona, es capaz de liberar al ovocito (Johnson, 2013). Recordemos que, gracias al pico de los niveles de LH, el ovocito primario sale del primer arresto meiótico en profase I y continúa su división celular. El número de cromosomas es distribuido a las futuras células hijas por igual (el ovocito secundario y el cuerpo polar); sin embargo, el citoplasma no se distribuye de manera igualitaria, quedándose el ovocito secundario con la mayor parte (Plant y Zeleznik, 2015).

Los cromosomas en el ovocito secundario continúan con la meiosis II. Éste, junto con el primer cuerpo polar, se encuentra dentro de la zona pelúcida (ZP), que es una capa de glicoproteínas sintetizadas por el ovocito secundario en crecimiento (Sadler, 2012). Al llegar a la metafase II el ovocito sufre nuevamente un arresto meiótico por la acción de un complejo proteico llamado factor citostático, en esta fase será ovulado en algunas especies de mamíferos (Johnson, 2013).

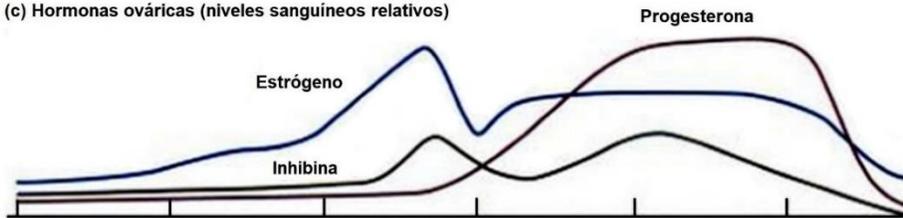
(a) Procesos que tienen lugar en el ovario



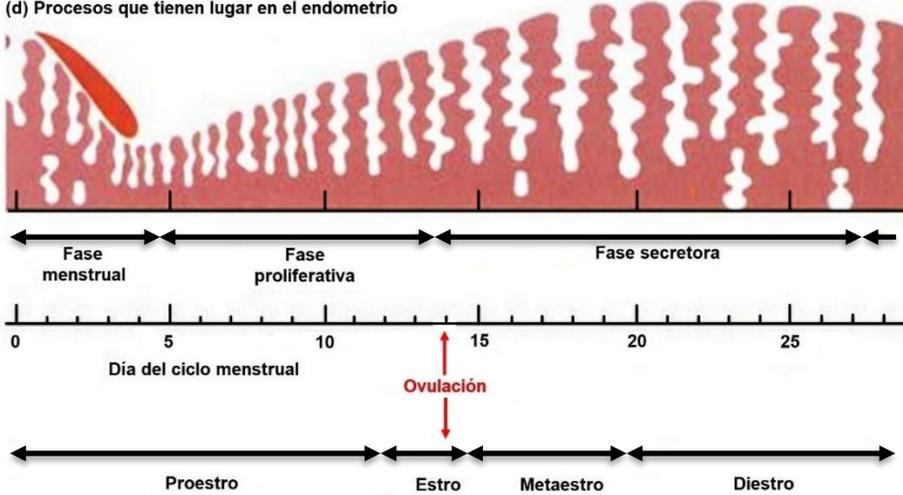
(b) Gonadotropinas provenientes de la hipófisis anterior (niveles sanguíneos relativos)



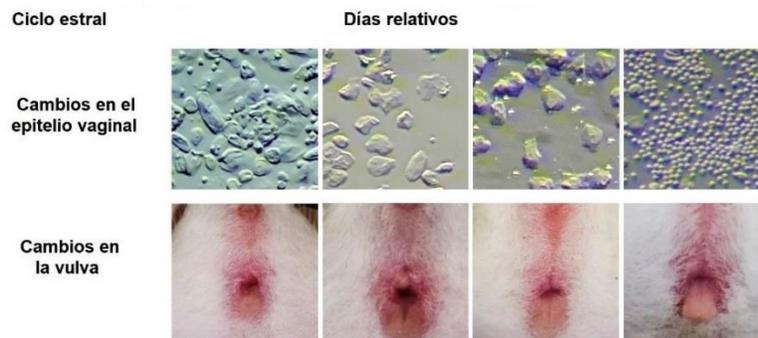
(c) Hormonas ováricas (niveles sanguíneos relativos)



(d) Procesos que tienen lugar en el endometrio



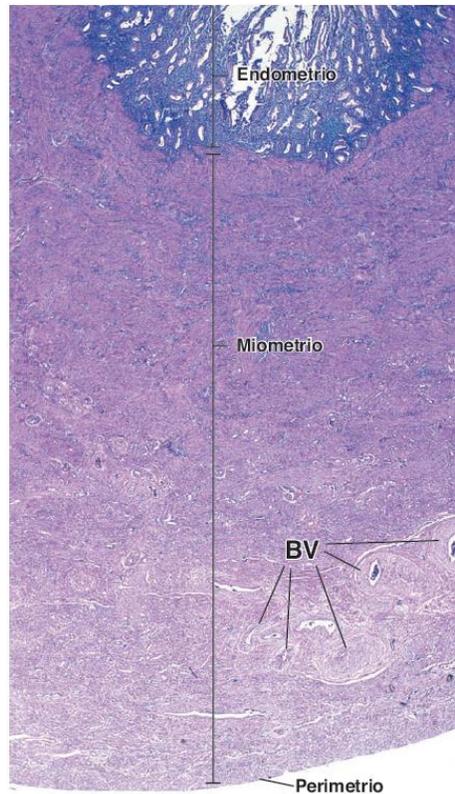
(e) Ciclo estral



**Figura 2. Fases de los ciclos menstrual y estral.** Interacción hormonal durante los ciclos ovárico y uterino. (a) (d) Relación entre los procesos de las fases de los ciclos ovárico y endometrial. (b) (c) La secreción e interacción de gonadotropinas y hormonas ováricas es similar en los ciclos menstrual y estral. Los niveles séricos de las gonadotropinas provenientes de la hipófisis anterior y las hormonas ováricas son dependientes de los procesos celulares que ocurren en el ovario y en el útero. (e) Cambios en el epitelio vaginal y en la vulva a través del ciclo estral (Modificada de Hill *et al.* 2004).

La parte final de la fase folicular en el ovario se traslapa con la fase proliferativa del útero (Hill *et al.* 2004; Fig. 2). Gracias a los estrógenos sintetizados en el folículo el útero sufre grandes cambios para poder implantar al embrión (Matorras *et al.* 2008). La pared uterina está constituida por tres capas: la capa más externa se denomina perimetrio (Fig. 3), ésta es la cubierta peritoneal visceral del útero; la capa intermedia denominada miometrio, es muscular y se encuentra conectada con la capa muscular de las trompas uterinas y de la vagina; la capa más interna es el endometrio, una capa mucosa que reviste la cavidad uterina, ésta y el miometrio sufren cambios cíclicos mensuales con la misma finalidad (Ross y Pawlina, 2016).

El endometrio tiene su origen embrionario en el revestimiento mucoso de los conductos de Müller, cubre la cavidad del útero y sufre la mayor parte de los cambios morfológicos y fisiológicos. Tiene dos capas principales, una funcional y otra basal. La capa funcional es la encargada de proliferar y secretar glicoproteínas en cada ciclo para la implantación del embrión (Matorras *et al.* 2008), la capa basal es el tejido que sirve para regenerar la capa funcional después de su degeneración (Matorras *et al.* 2008). En respuesta a los estímulos hormonales el número de mitosis es mayor en las dos terceras partes de la capa funcional más cercanas a la luz del útero que en la parte más cercana a la capa basal, debido a que estas regiones requieren de cambios rápidos y constantes para poder llevar a cabo la implantación del embrión y el mantenimiento de la integridad de la mucosa endometrial (Botella, 1997).



**Figura 3. Fotomicrografía de un corte sagital de un útero humano.** Se observan las tres capas de la pared uterina: El endometrio, la capa más interna que reviste a la cavidad uterina; el miometrio, la capa intermedia de músculo liso (la porción más proximal al perimetrio contiene los vasos sanguíneos mayores; *blood vessels*: BV); el perimetrio, capa que cubre la superficie externa del útero (Tomada de Ross y Pawlina, 2016).

El endometrio se apoya sobre otra capa llamada estroma, constituida principalmente por tejido conjuntivo, ésta separa a la capa mucosa del miometrio (Matorras *et al.* 2008). En la fase proliferativa del útero, que es regulada por estrógenos, proliferan las células del estroma y secretan colágeno, entre otras sustancias necesarias para la implantación del embrión; las células de la región glandular basal reconstituyen las glándulas y recubren la cavidad uterina con mucosa; las células endoteliales de los vasos sanguíneos también proliferan y las arterias espirales crecen conforme el endometrio va reestructurándose, aunque no llegan hasta la parte más interna de éste (Ross y Pawlina, 2016). Asimismo, las células superficiales y glandulares desarrollan cilios y microvellosidades con el fin de distribuir las secreciones durante la fase progestacional (Botella, 1997). En esta fase de proliferación el endometrio ha aumentado significativamente su espesor y continúa así hasta un día después de la ovulación, que corresponde aproximadamente al día 14 en un ciclo de 28 días (Ross y Pawlina, 2016).

Posterior a este periodo, prosigue la fase secretora del útero, que se superpone a la fase lútea del ovario (Hill *et al.* 2004); gracias al cuerpo lúteo se secretan grandes cantidades de progesterona. Esta hormona, junto con el estradiol, hace que el endometrio gane más espesor debido a su edematización y que sus glándulas secreten y almacenen sustancias ricas en nutrientes, principalmente glucógeno, para la implantación del blastocisto. De igual manera se prepara al cérvix para recibir a los espermatozoides y la progesterona inhibe la producción de FSH, por consiguiente, la maduración de los folículos se detiene (Gilbert, 2019; Ross y Pawlina, 2016; Matorras *et al.* 2008).

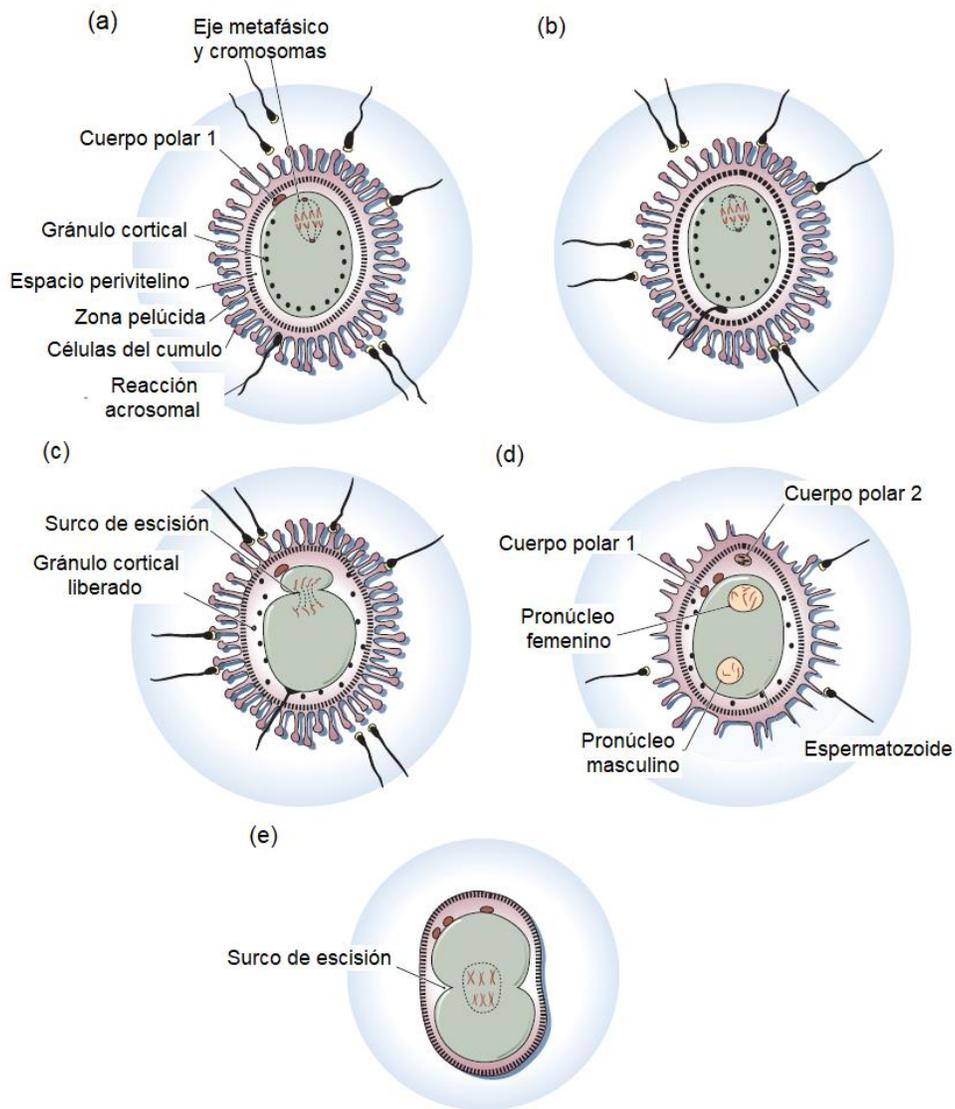
Si la fecundación no se lleva a cabo el ovocito muere y el cuerpo lúteo alcanza su máxima maduración formando al *corpus albicans*. Los niveles de progesterona y de estrógenos en el suero sanguíneo disminuyen y, como consecuencia, hay una vasoconstricción en el endometrio, lo que favorece la necrosis de sus células y su descamación, entonces ocurre una hemorragia y se desprende la pared uterina. Este evento, llamado menstruación, se da al mismo tiempo que la primer parte de la fase folicular; 48 h después de que la fase menstrual inicia, toda la capa funcional se ha descamado (Hill *et al.* 2004; Sadler, 2012; Matorras *et al.* 2008). En la mayoría de los mamíferos, incluidos los ratones, el endometrio se reabsorbe en lugar de desprenderse y es sustituido por una capa de células estromales cubiertas con células epiteliales que se preparan para dar inicio a un nuevo ciclo uterino (Johnson, 2013); de igual manera, al bajar los niveles de progesterona, la hipófisis vuelve a secretar FSH, iniciando un nuevo ciclo ovárico (Gilbert, 2019).

#### 1.1.4 Fecundación

La fecundación es el fenómeno mediante el cual el gameto femenino y el masculino fusionan su material genético, sin embargo, ésta no sería posible sin que se lleve a cabo la capacitación espermática, que es una serie de procesos mediante los cuales los espermatozoides adquieren capacidades para reconocer las señales que los guiarán hacia el o los óvulos, realizar la reacción acrosomática y fusionarse con la membrana del gameto femenino. Los espermatozoides recién eyaculados no pueden fecundar a un óvulo debido a que son inmaduros, son las células del oviducto quienes les confieren esta madurez, es decir, en los mamíferos los espermatozoides terminan su desarrollo dentro de los oviductos (Gilbert, 2019).

Una vez capacitados, los espermatozoides son atraídos al ovocito secundario por quimiotaxis; antes de entrar en contacto ambos gametos, el o los espermatozoides tienen

que atravesar el cúmulo de células de la granulosa. La fecundación ocurre en el ámpula del oviducto, una vez que el primer espermatozoide llega a la ZP del ovocito se desencadena la reacción acrosómica (Fig. 4), que es una serie de cambios morfológicos y fisiológicos del espermatozoide para digerir la ZP gracias a enzimas hidrolíticas de la región acrosómica. Luego de cruzar la ZP el o los espermatozoides quedan en el espacio perivitelino, posteriormente, su membrana se fusiona con la membrana plasmática del ovocito secundario activando una serie de ondas de calcio que terminan con el arresto meiótico en metafase II en el que estaba el ovocito, de esta manera se completa la segunda división meiótica y se produce el segundo cuerpo polar y el pronúcleo femenino; al mismo tiempo, el núcleo espermático se descondensa y forma el pronúcleo masculino (Gilbert, 2019; Johnson, 2013). Los cromosomas de ambos pronúcleos duplican su ADN y sus membranas se rompen, de esta manera ambos cromosomas, maternos y paternos, se alinean y se preparan para una división mitótica, entonces se forma un cigoto diploide (Behringer, *et al.* 2014).



**Figura 4. Fecundación.** (a) Ovocito con su primer cuerpo polar y varios espermatozoides intentando penetrar la ZP, uno logra unirse a ésta y desencadena la reacción acrosomal; los cromosomas se encuentran en huso de metafase II. (b) Espermatozoide penetrando la ZP para ubicarse en el espacio perivitelino. (c) Unión y fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito, activando así una serie de ondas de calcio que inducen la liberación de gránulos corticales y la reanudación de la meiosis con la formación de un surco de escisión, hendidura que inicia la citocinesis. (d) Se completa la división meiótica, produciendo el segundo cuerpo polar y el pronúcleo femenino. El núcleo del espermatozoide se descondensa y se forma el pronúcleo masculino. (e) Los cromosomas duplican su ADN, los pronúcleos migran juntos y sus membranas se rompen cuando se forma el primer huso mitótico. Las cromátidas se separan y se desarrolla un surco de escisión. En esta etapa, las células del cúmulo se han dispersado. (Tomada de Johnson, 2013).

### 1.1.5 Implantación del blastocisto y decidualización

El embrión, durante su viaje del oviducto al endometrio comienza a desarrollarse aumentando el número de sus células mediante un proceso llamado segmentación. En los mamíferos esta segmentación es asincrónica, es decir, no todas sus blastómeras se dividen al mismo tiempo; por lo tanto, los embriones no aumentan exponencialmente el número de sus células, sino que contienen números impares de éstas (Gilbert, 2019).

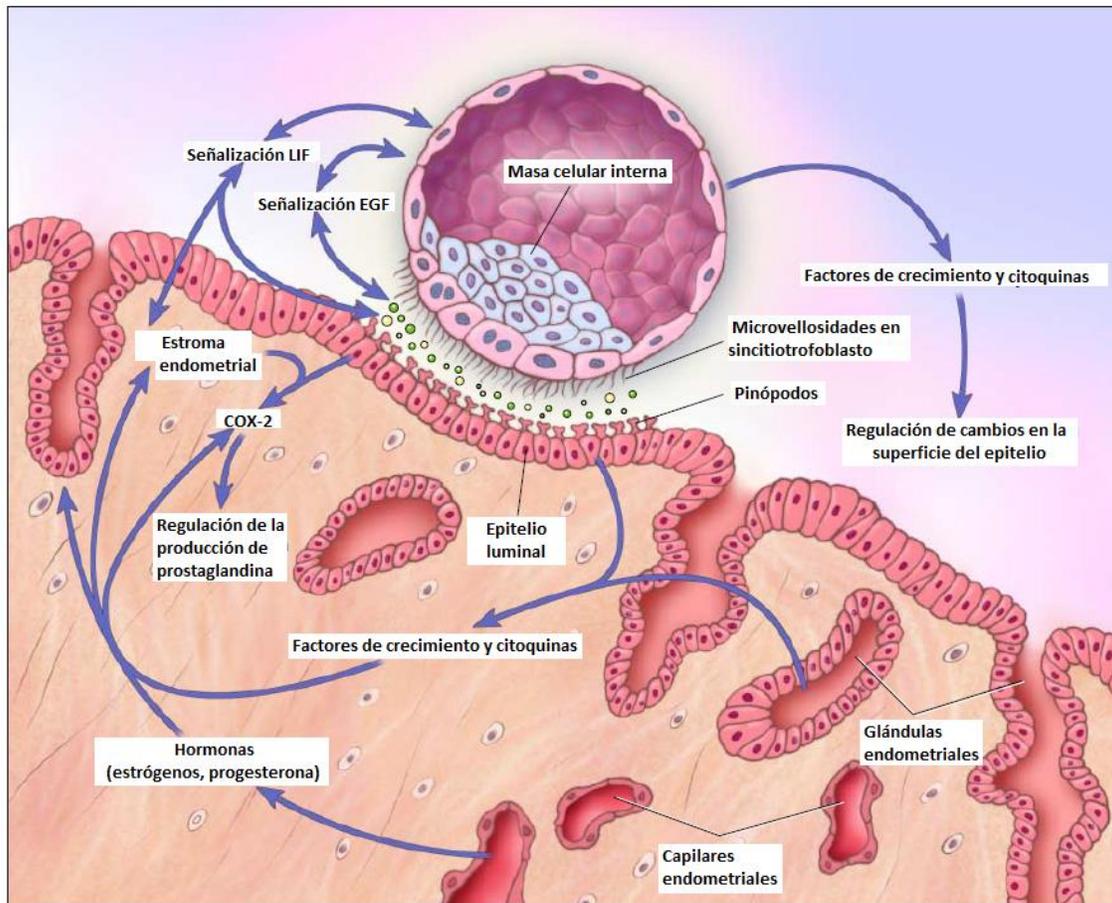
Después de la tercera segmentación, algunos genes de adhesión celular, como los de *E-cadherina*, se comienzan a expresar, lo cual hace que las blastómeras se agrupen y compacten. En la mayoría de los mamíferos para el día 4-5 post fecundación el embrión se convierte en una mórula compacta y se puede visualizar un grupo pequeño de células internas rodeadas por un grupo más grande de células externas. Además, ocurre un proceso llamado cavitación, mediante el cual se forma una cavidad dentro de la masa de células llamado blastocele, lo cual es signo del comienzo de la formación del blastocisto, que en ese momento está formado por aproximadamente 200 células (Gilbert, 2019; Hedrich, 2012). En este momento pueden distinguirse dos tipos celulares en el embrión, la masa celular externa o trofoectodermo y la masa celular interna (MCI) (Fig. 5); las células del trofoectodermo darán lugar al tejido del corion y la porción embrionaria de la placenta, y la MCI, en su mayoría, al disco embrionario (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2007) que posteriormente será el embrión, con el saco vitelino, alantoides y amnios asociados (Gilbert, 2019).

El trofoblasto, que es la capa celular que rodea a las blastómeras encargada de la nutrición del embrión, secreta luteotropina en ratones o gonadotropina coriónica humana (*human gonadotropin corionic*: hGC) en el caso de las mujeres, que evita la degeneración del cuerpo lúteo (Sadler, 2012; Johnson, 2013). Éste continúa secretando estrógenos y, después, altos niveles de progesterona para que, finalmente, al cuarto día de gestación en ratones, ocurra un pequeño aumento de estrógenos que coincide con un aumento de los niveles de expresión en el útero del factor inhibidor de leucemia (*leukemia inhibitory factor*: LIF), esencial para que el endometrio pueda recibir al embrión (Behringer *et al.* 2014; Fig. 5).

La implantación es el proceso mediante el cual se da la interacción física y fisiológica entre endometrio y blastocisto (Hoozemans *et al.* 2004). Los esteroides ováricos, el estrógeno y la progesterona, son los principales factores que la regulan, un desequilibrio entre estas

hormonas ocasionaría un retraso en la maduración endometrial y por lo tanto una falla en la implantación (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2007). Durante el viaje del blastocisto hacia el útero la ZP evita que se adhiera prematuramente al oviducto, una vez allí tiene que abandonar la ZP para poderse implantar, proceso denominado eclosión o *hatching* (Gilbert, 2019; Hedrich, 2012). Para este momento el endometrio debe haber adquirido un estado morfológico maduro y funcional mediado por las hormonas esteroideas ováricas, como aumento en su grosor, en la vascularización, en el número de glándulas y en la cantidad de secreciones de estas (Kumar y Sharma, 2012). Esta síntesis de moléculas de adhesión, sustancias de la matriz extracelular y receptores de superficie en el blastocisto para estas sustancias, tiene la finalidad de permitir la implantación, nutrir al embrión mediante la irrigación sanguínea y proveerlo de factores de crecimiento (EGF, TGF- $\beta$ , FGF), factores de transcripción (Hox), hormonas ováricas y citoquinas (interleucinas IL-6, IL-11) para inmunorregular la gestación y permitir su correcto desarrollo (Achache y Revel, 2006; Ramathal *et al.* 2010).

El proceso de implantación puede dividirse en tres partes esenciales: la aposición, la adhesión y la invasión. La aposición es la primera conexión entre el blastocisto y el endometrio, la cual es poco estable; el trofoblasto se une a una de las paredes del epitelio luminal, las microvellosidades en la superficie apical del sincitiotrofoblasto (capa más externa del trofoblasto en la cual los límites celulares desaparecen y se forma una célula con muchos núcleos) se interdigitan con las microprotrusiones de la superficie apical del epitelio uterino, llamadas pinópodos. Este fenómeno fija el futuro eje anteroposterior del embrión, que es más o menos perpendicular al eje longitudinal del cuerno uterino (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2007; Hedrich, 2012; Kumar y Sharma, 2012; Fig. 5). Posteriormente sucede la adhesión, que es una unión más estrecha y estable que sucede gracias a la participación de una familia de moléculas de adhesión celular (*cell adhesion molecules: CAMs*) compuesta por integrinas, cadherinas, selectinas e inmunoglobulinas (Kumar y Sharma, 2012; Fig. 5), reguladas por progesterona (Hoozemans *et al.* 2004). Durante esta etapa el estroma se vasculariza más en el área de contacto con el blastocisto, en ratones ocurre al día 4 post-fecundación y en humanos entre los días 20 y 21 (Sharkey y Smith, 2003).

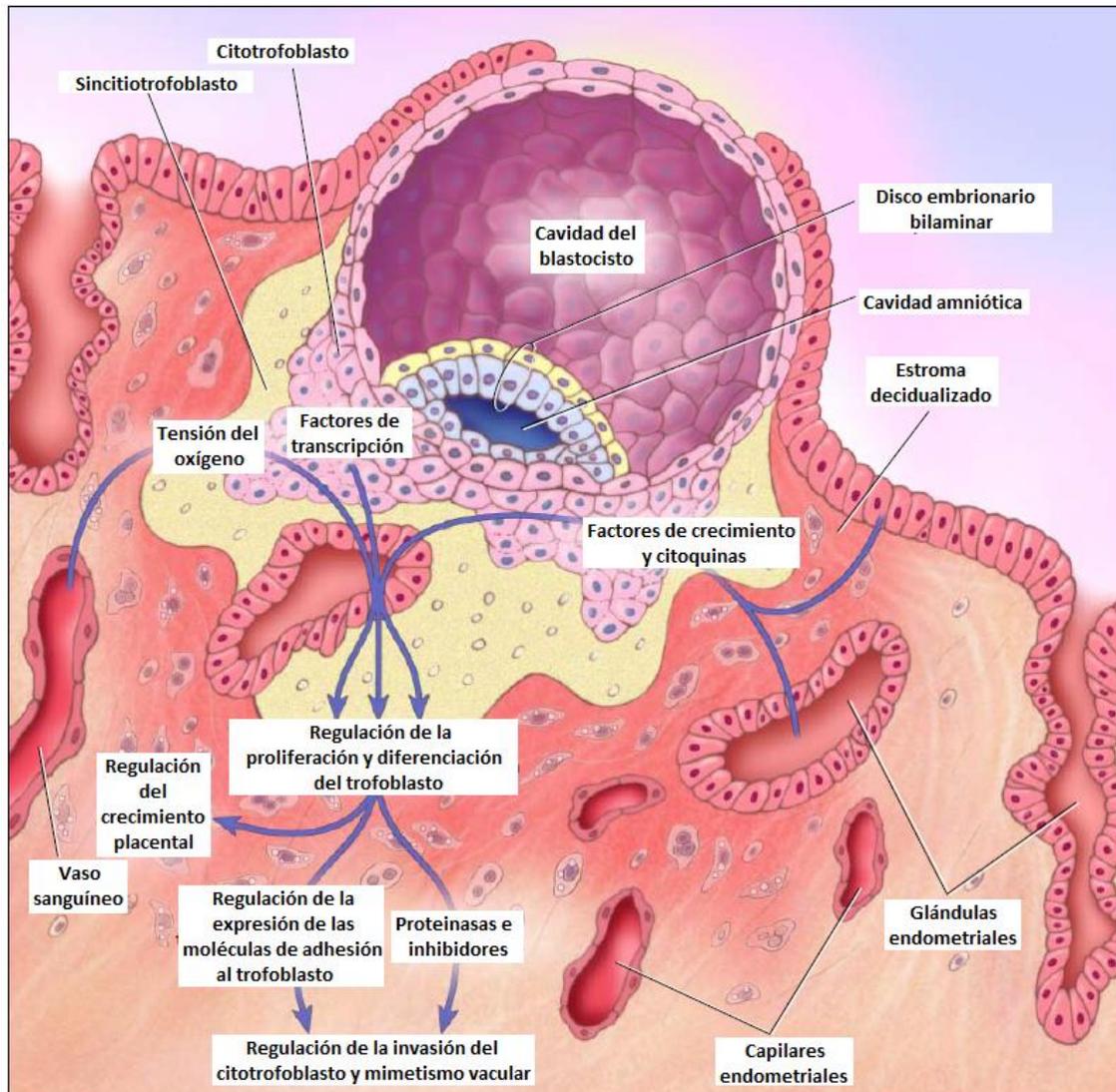


**Figura 5. Aposición y adhesión del blastocisto.** Se muestra un blastocisto en etapa de preimplantación, las estructuras endometriales y los procesos necesarios para la receptividad uterina, la aposición y la adhesión del blastocisto. LIF: El Factor inhibidor de leucemia está implicado en la diferenciación celular, EGF: El Factor de crecimiento epidérmico es una proteína que estimula el crecimiento y la diferenciación celular, COX-2: La ciclooxigenasa 2 es una de las dos isoformas de la enzima que limita la velocidad de conversión del ácido araquidónico en prostaglandina  $H_2$ , está restringida al sitio de implantación y depende de la presencia de un blastocisto listo para implantarse, está estrechamente relacionada a una correcta placentación. La desregulación de la familia de factores de crecimiento EGF y COX-2 en el útero durante la pre-unión y unión del blastocisto con el epitelio luminal se correlaciona con el fracaso de la implantación en ratones deficientes de LIF. (Tomada de Norwitz *et al.* 2001).

Por último, ocurre la invasión. Existen algunas especies en las cuales se da una implantación no invasiva, es decir, que la integridad epitelial se conserva o se rompe solamente en el área de contacto y esta lesión es transitoria. Sin embargo, en algunos primates y en los roedores se da una implantación de tipo invasiva (Fig. 6), en donde las células del trofoectodermo proliferan y penetran el epitelio luminal y su lámina basal hacia el estroma para establecer una relación vascular y, por lo tanto, más estrecha con la madre. Estas células que penetran los epitelios se diferencian para convertirse en un

sincitiotrofoblasto; el resto del trofoblasto que rodea la MCI se denomina citotrofoblasto (Guzeloglu-Kayisli *et al.* 2007; Kumar y Sharma, 2012; Johnson, 2013).

En respuesta a la invasión, las células mesenquimales del estroma comienzan a proliferar y a diferenciarse. El endometrio que rodea al embrión implantado, a partir de que las células del compartimento estromal sufren cambios para albergar y nutrir al embrión, es llamado decidua, sus células se vuelven más grandes y redondeadas (Botella, 1997; Ramathal *et al.* 2010) llenándose de lípidos, glucógeno y tomando una forma poliédrica que es característica de estas células (Hedrich, 2012). Este proceso denominado decidualización, está regulado por estrógenos y progesterona (Timeva *et al.* 2014) y, probablemente, el blastocisto juega un papel importante en éste y en el mantenimiento de la decidua (Kumar y Sharma, 2012). Las células continúan penetrando aún más el estroma uterino hasta que, finalmente, todo el embrión se encuentra incrustado en el endometrio. Después, el tejido glandular y el tejido decidual se destruyen y liberan carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas que serán absorbidos por el embrión en crecimiento; el sincitiotrofoblasto entra en contacto con la sangre materna y forman microvellosidades, que son pequeñas proyecciones de lo que será la placenta, llamadas vellosidades coriónicas (Kumar y Sharma, 2012; Johnson, 2013).



**Figura 6. Implantación del blastocisto.** Se muestran las estructuras del blastocisto además de las estructuras del endometrio y los procesos necesarios para la invasión del trofoblasto. (Tomada de Norwitz *et al.* 2001).

Uno de los factores de transcripción que es regulado por progesterona y estrógenos es el factor con caja homeótica A10 (Homeobox A10: Hoxa10), que se expresa en el estroma subepitelial de ratón a los 3.5 dpc y persiste hasta los 4.5 dpc. Estudios en humanos han revelado que al reprimir este factor de transcripción se produce una falla en la deciduación y, consecuentemente, estos úteros no son receptivos, por lo que se concluye que Hoxa10 se encuentra estrechamente relacionado con la implantación (Ramathal *et al.* 2010).

Otro marcador de la receptividad endometrial que está regulado por estas hormonas y se encuentra implicado en la implantación del embrión es MUC1, esta glicoproteína de la familia de las mucinas es parte del glicocálix epitelial apical, el primer contacto de la decidua con el embrión. Esta capa de glicoproteínas funge como barrera inmune, además MUC1 se expresa durante la fase no receptiva en los epitelios glandular y luminal del útero, actuando como una barrera antiadherente al blastocisto; en los ratones su expresión disminuye notablemente a los 3.5 dpc durante la ventana de implantación (Aplin, 2006; Inyawilert *et al.* 2016) por el contrario, MUC1 en humanos se encuentra en bajas concentraciones en el epitelio glandular durante la fase proliferativa y en altas concentraciones en los epitelios luminal y glandular durante la fase secretora, es decir, su expresión es alta durante la ventana de implantación (Meseguer *et al.* 1998), sin embargo, deja de expresarse en las células del endometrio en donde se implanta el blastocisto y en las células adyacentes a este sitio (Aplin, 2006), existe evidencia de que el o los blastocistos sanos regulan la presencia de MUC1 en el endometrio (Hoffman *et al.* 1998).

En ratones se ha observado que MUC1 es regulado de manera negativa por *let-7a* y *let-7b*, pertenecientes a una familia de microRNAs que regula la gestación temprana ya que la expresión de *let-7b* aumenta gradualmente desde la fase pre-receptiva (0.5 dpc) hasta la receptiva (3.5 dpc) y la expresión de *let-7a* en el útero es inducida por el blastocisto en el proceso de decidualización e invasión y se expresa en los epitelios glandular y luminal a los 3.5 dpc, teniendo una alta expresión en la decidua a los 5.5 dpc (Inyawilert *et al.* 2015; Inyawilert *et al.* 2016); así mientras la expresión de MUC1 va disminuyendo conforme a los días post coito, la expresión de éstos miARNs va en aumento. La desregulación de estos mecanismos conlleva a una serie de alteraciones en el proceso de implantación las cuales se explicarán más adelante.

## **1.2 Problemas de la reproducción**

La infertilidad es un problema que se presenta en el 10-15% de las parejas a nivel mundial (Ramathal *et al.* 2010), en los hombres puede deberse al número insuficiente de espermatozoides o a la mala calidad de éstos. En las mujeres, la infertilidad puede deberse a múltiples factores como alteraciones de la ovulación (Insuficiencia Ovárica Prematura) o factores tubáricos o peritoneales tales como endometriosis, secuelas de infecciones de transmisión sexual, problemas uterinos, cervicales o inmunológicos (Rosas, 2008).

La insuficiencia ovárica prematura es la pérdida de la función ovárica antes de los 40 años por la falla de secreción pulsátil de FSH, LH y GnRH; sus causas pueden deberse a defectos genéticos, a procesos autoinmunes o infecciosos, por radiación, cáncer y por causas no identificadas (European Society of Human Reproduction and Embryology, 2016). El cáncer de ovario se presenta de diferentes maneras, los tumores epiteliales son una de éstas y representan el 90% de los tipos de cáncer ovárico (Badgwell & Bast, 2007). Otro de los desórdenes ováricos que causan infertilidad es el síndrome del ovario poliquístico, este es un síndrome endocrino y metabólico que, además de presentar los ovarios poliquísticos, se caracteriza por anomalías menstruales como la ausencia de ovulación e hiperandrogenismo, las causas son la resistencia a la insulina, los niveles altos de LH, la producción excesiva de andrógenos por las células teca y niveles elevados de estrógenos producidos por estas mismas células. Esta alteración en el metabolismo puede ser uno de los factores implicados en la formación del cáncer endometrial (Norman *et al.* 2004).

### 1.2.1 Problemas de la reproducción asociados al endometrio

En México el cáncer endometrial ocupa el tercer lugar de los cánceres ginecológicos (Zeferino *et al.* 2013) y el segundo a nivel mundial (Montalvo *et al.* 2011). Hasta el día de hoy se han descrito dos tipos de cáncer endometrial:

- Tipo I: Dependiente de estrógenos, representa más del 80% de estos cánceres. Es causado por una estimulación estrogénica constante y persistente sin un balance de progesterona y los factores de riesgo para padecerlo son la nuliparidad, la obesidad, la menopausia tardía y el uso de tamoxifen (Fowler y Mutch, 2008; González y Olguín, 2017).
- Tipo II: Es independiente de estrógenos y es más agresivo que el cáncer de tipo I, desafortunadamente los mecanismos patológicos de la formación de este tipo cancerígeno aún no son bien conocidos (Fowler y Mutch, 2008; González y Olguín, 2017).

La endometriosis es otro desorden dependiente de estrógenos en donde hay presencia de tejido endometrial (tejido glandular y estromal) fuera de la cavidad uterina (Greaves *et al.* 2014; Mehedintu *et al.* 2014), este desorden ha sido asociado con la infertilidad, aunque los mecanismos que lo acompañan aún no han sido bien descritos. Lessey y Kim (2017) comparten una compilación de evidencias que apoyan la idea de que la endometriosis está

asociada con la receptividad endometrial. Explican que hay estudios en donde se ha demostrado que pacientes con endometriosis presentan infertilidad debido a fallas en la implantación y otros mecanismos aún no conocidos; también, que las tasas de fertilidad en mujeres con esta condición que son sometidas a inseminación intrauterina son más bajas que las de mujeres sin endometriosis; además, el tratamiento para este desorden, que consiste en la ablación laparoscópica en endometriosis leves, ha mostrado beneficiar la fertilidad en mujeres infértiles. Por otro lado, Miravet y colaboradores (2017) hicieron otra revisión de estudios en donde se demuestra que la endometriosis no afecta la receptividad uterina; en uno de esos estudios se hizo una donación de ovocitos, se realizó fertilización *in vitro* (FIV) y se trasplantaron a mujeres con endometriosis y a mujeres que no presentaban esta afectación, como resultado, la receptividad endometrial no se vio comprometida en pacientes con la afectación, lo que va en contra de lo concluido por otros investigadores. Debido a que muchos de los procesos moleculares involucrados en esta afección siguen sin conocerse, este tema se ha vuelto muy controversial. La infertilidad asociada a la endometriosis puede ser multifactorial, se ha observado que la anatomía pélvica se distorsiona, lo cual perjudica la liberación y/o captación de los ovocitos y causa contracciones miométricas desordenadas, asimismo, están siendo estudiados algunos posibles factores etiológicos de la afección, como la expresión aberrante de genes asociados a factores angiogénicos (Latham y Taylor, 2012).

### **1.3 Estrategias para la reproducción asistida**

La reproducción asistida (RA) consiste en ciertos procedimientos en donde los espermatozoides, los óvulos o los embriones son manipulados *in vitro* con el objetivo de lograr una gestación exitosa. Algunas de estas estrategias involucran la administración exógena de hormonas para suprimir el ciclo menstrual natural y de otras hormonas para estimular el crecimiento de los folículos ováricos, realizando un seguimiento de éste. Al llegar a un tamaño apropiado se administra otro tratamiento hormonal para lograr la maduración folicular final y, de esta manera, activar la ovulación; los ovocitos resultantes se recolectan para realizar la FIV o la inyección intracitoespermática (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI) y una vez que se logra la fecundación, los embriones obtenidos se cultivan para lograr su correcto desarrollo y así poderlos transferir al útero de la paciente con su endometrio previamente preparado. Para preparar el endometrio existen diferentes métodos: Puede utilizarse el ciclo natural de la paciente y transferir los embriones determinando el momento del aumento espontáneo de la LH; el método del ciclo natural

modificado, el cual se basa en el ciclo natural, pero se administra la hCG para iniciar la luteinización; y la administración exógena de estrógenos y progesterona (Kalem *et al.* 2016). El siguiente paso es mantener activo al cuerpo lúteo mediante un tratamiento hormonal, para que la gestación se lleve a cabo adecuadamente (Farquhar *et al.* 2018).

Entre las técnicas de reproducción asistida (RA) más utilizadas se encuentra la inseminación artificial, en donde no hay extracción de ovocitos, sino que los espermatozoides se introducen al útero y la fecundación sucede dentro del tracto reproductivo de la mujer (Crawford *et al.* 2016). La extracción espermática y la donación de ovocitos son otras técnicas, en esta última se recurre al uso de la administración hormonal para inducir el crecimiento y la maduración de un mayor número de folículos y la ovulación de múltiples ovocitos, a esto se le denomina superovulación (Hasegawa *et al.* 2016).

Los gametos obtenidos por las técnicas de RA son criopreservados y se pueden utilizar posteriormente en otras de las técnicas como la FIV, en ésta se obtienen los ovocitos de los folículos maduros para ser fertilizados *in vitro* y no dentro del tracto reproductivo femenino. Otra de las técnicas más utilizadas, en caso de que exista un problema con la motilidad de los espermatozoides, es la ICSI, que consiste en la selección del mejor espermatozoide, dada su motilidad y apariencia, y la posterior inyección de éste al citoplasma del óvulo mediante un equipo de microinyección, además de sus variantes (inyección fisiológica intracitoplasmática de espermatozoides, PICSI por sus siglas en inglés y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides seleccionados morfológicamente, IMSI por sus siglas en inglés) (Villaquirán *et al.* 2020).

Además, existe un método llamado Diagnóstico Genético Preimplantacional, el cual sirve para evaluar si los embriones u ovocitos obtenidos *in vitro* presentan defectos mendelianos o monogénicos, es decir, defectos en un gen particular, mitocondriales o cromosómicos, de esta manera pueden escogerse los mejores para la FIV o para la transferencia embrionaria (Geraedts y De Wert, 2009). Actualmente la FIV es uno de los tratamientos más efectivos para la infertilidad (NHS Foundation Trust, 2018; Taft, 2017).

A pesar de los avances en las tecnologías de reproducción asistida (TRA) muchas parejas no logran procrear, una de las causas principales es la implantación fallida de los embriones fertilizados, incluso siendo de buena calidad, lo cual indica que el problema también puede

residir en el útero. En condiciones naturales, solamente el 35% de los embriones humanos logran implantarse (Simón *et al.* 2000) ya sea por problemas intrínsecos del embrión o por fallas en los procesos fisiológicos durante los cambios necesarios que ocurren para la implantación del blastocisto en el útero.

En la RA se considera una implantación exitosa cuando el embrión forma un saco gestacional intrauterino detectable por la ecografía, alrededor de la quinta semana de gestación (Gellersen *et al.* 2014), para que esto ocurra muchos factores deben coordinarse: el embrión debe tener un número de células correspondiente al estadio de blastocisto, las blastómeras deben ser del mismo tamaño y deben tener una distribución uniforme del citoplasma (Coughlan, *et al.* 2014) y, sobre todo, una coordinación fina de las señales autocrinas, paracrinas y endocrinas entre las interacciones celulares en el mismo endometrio, las propias del embrión y las interacciones endometrio-embrión, todas éstas reguladas principalmente por esteroides sexuales, hCG, factores de crecimiento, citocinas, moléculas de adhesión, prostaglandinas y proteínas de la matriz extracelular (Dey *et al.*, 2004). Además, también entra en juego la restricción materna, que es la acción inmunológica de la madre contra el embrión, ésta podría ser una causa de la falla de implantación o falla de una placentación adecuada. De los embarazos que no logran llegar a término, el 75% es por falla en la implantación, incluso este evento también es un factor limitante de gran importancia en la RA (Hoozemans *et al.* 2004).

El consorcio de Diagnóstico Genético Preimplantacional de la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana definió la falla de implantación recurrente (FIR) como la ausencia de implantación después de tres o más transferencias de embriones; algunos autores la refieren como una situación en la que nunca ha habido evidencia de implantación, es decir, los niveles de hGC nunca fueron detectables debido a que el problema en la gestación ocurrió en una etapa muy temprana, durante la invasión o la migración del embrión a través de la superficie luminal del útero, o, en el caso de ser detectables los niveles de esta hormona, en la última etapa para que se logre el embarazo, como en la formación de un saco gestacional (Koot *et al.* 2012; Coughlan *et al.* 2014; Timeva *et al.* 2014). Existen tres diferentes tipos de FIR:

- La multifactorial, que incluye los factores masculinos, los femeninos, las anomalías genéticas del embrión, factores inmunológicos, etc.
- La endometrial que se debe a factores propios del endometrio.

- La idiopática, en donde hay un fallo inexplicable en la comunicación útero-embrión (Timeva *et al.* 2014).

El entorno que le proporciona el útero al embrión es un factor crucial para la implantación, las anomalías uterinas congénitas afectan la receptividad endometrial (Coughlan *et al.* 2014), además existen estudios en donde se ha descrito que la administración de hormonas exógenas afecta también la receptividad endometrial (Ertzeid y Storeng, 2001; Haouzi *et al.* 2009).

#### **1.4 Superovulación**

Como se mencionó, algunas de las TRA requieren de la administración de gonadotropinas exógenas para anular el mecanismo molecular encargado de seleccionar a un solo folículo dominante y estimular el desarrollo de múltiples folículos, además de promover la posterior ovulación de todos los ovocitos maduros. En humanos se administra un antiestrógeno para eliminar el control de retroalimentación negativa de la secreción de gonadotropina hipofisaria, de esta manera aumentan los niveles endógenos de FSH y LH; también se utilizan la FSH, la gonadotropina sérica de yegua preñada (*pregnant mare's serum gonadotropin*: PMSG) la gonadotropina coriónica equina (*equine chorionic gonadotropin*: eCG) o la gonadotropina menopáusica humana (*human menopausal gonadotropin*: hMG) para la maduración folicular, y la LH y la hCG para inducir la ovulación (Stouffer y Zelinski, 2004; Park *et al.* 2015). En ratones, el método convencional es la inyección de PMSG seguida de una inyección de hCG dos días después de la primera (Park *et al.* 2015).

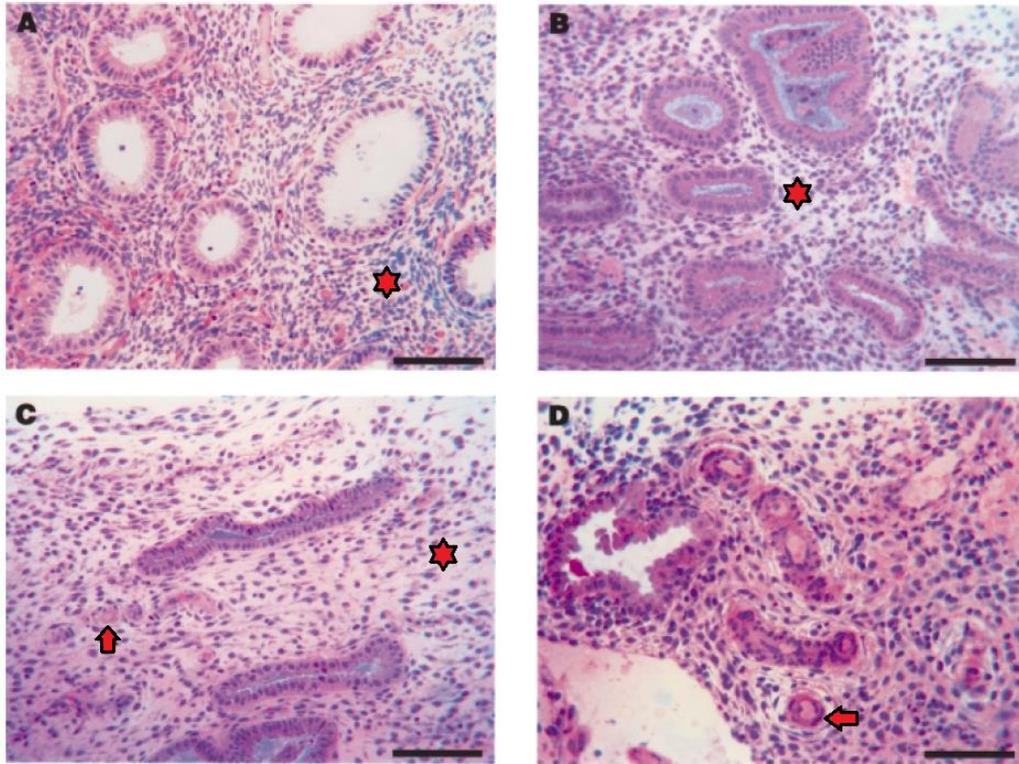
## **2. ANTECEDENTES**

A pesar del gran beneficio que ofrece la superovulación para obtener una mayor cantidad de ovocitos, el tratamiento con gonadotropinas exógenas trae graves consecuencias durante y después de la gestación, ya que los niveles de las hormonas utilizadas en los tratamientos de RA son extremadamente altos en comparación con los niveles endógenos, lo que resulta en el aumento de los niveles de estrógeno y progesterona sérica circulantes que se encuentran estrechamente asociados a alteraciones en la expresión de receptores específicos que interactúan con estas hormonas. Se ha reportado que la estimulación excesiva con gonadotropinas está asociada a un incremento en el riesgo de padecer síndrome de hiperestimulación ovárica (Basir *et al.* 2001), algunas consecuencias en la madre son hipertensión y sangrado durante el embarazo. También se ha visto que existe

afectación directa de la función del endometrio, comprometiendo de esta manera la implantación del embrión y, en cuanto a las afectaciones en el recién nacido, se ha reportado un bajo peso en éstos (Ertzeid y Storeng, 2001).

### **2.1 La superovulación y la función endometrial**

Basir y colaboradores en el 2001 realizaron un análisis morfométrico de los componentes glandulares y estromales del endometrio en mujeres, con el objetivo de saber si las altas concentraciones de estradiol sérico provocadas por la estimulación ovárica en mujeres infértiles afectaban de alguna manera la función endometrial al momento de la implantación. Lo que reportaron fue un mayor número de glándulas y volumen glandular endometrial (lo cual indica abundante secreción en la luz glandular) en las mujeres con ciclos naturales en comparación con las mujeres con ciclos estimulados, incluso observaron una relación inversamente proporcional entre el número y el volumen de éstas y la concentración de estradiol sérico, notando una tendencia en la disminución del número de las glándulas y de su tortuosidad es decir, de sus abundantes ondulaciones irregulares, a mayor concentración de estradiol circundante (Fig. 7). A las pacientes que mostraron una dosis elevada de estradiol sérico, las llamaron “respondedoras altas” (estradiol sérico  $\geq 20,000$  pmol/L) y se observó en ellas un retraso en la actividad secretora, lo que podría indicar un defecto en el transporte de secreciones desde el compartimento intracelular al luminal, también registraron vasos sanguíneos abundantes en el estroma endometrial, que indican una maduración arterial prematura, por lo que se concluye que los compartimentos estromal y glandular no reaccionan simultáneamente a la estimulación del estradiol sino que lo hacen de manera asincrónica en el momento en que debería haber una mayor receptividad uterina (Basir *et al.* 2001). El conjunto de todas estas afectaciones permite inferir que existe una gran alteración durante la ventana de implantación, lo cual causa una baja tasa de embarazos reportados en estas pacientes en comparación con las pacientes de ciclos naturales y las que responden de manera moderada (estradiol sérico  $< 20,000$  pmol/L) al tratamiento con gonadotropinas (Basir *et al.*, 2001).



**Figura 7. Morfología del endometrio que muestra etapas variables de desarrollo glandular y estromal en los ciclos naturales y los ciclos de estimulación ovárica de personas con respuesta moderada y respuesta alta a la estimulación gonadótropa.** (A) Biopsia endometrial de ciclo natural que muestra desarrollo de las glándulas en la misma fase y cantidades bajas de edema estromal (\*). (B) Respuesta moderada: Endometrio que muestra el desarrollo coordinado de glándulas y estroma (\*) después de la estimulación ovárica. (C y D) Respuesta alta: Muestran disincronía entre el desarrollo estromal y glandular (desarrollo glandular retardado y características del edema estromal (\*\*)). Las flechas muestran la maduración apropiada de arterias espiraladas para la fase secretora tardía. Bar = 100  $\mu$ m (Tomada de Basir *et al.* 2001).

Por otra parte, se han realizado estudios del perfil de expresión génica en el endometrio humano durante el periodo de receptividad, en uno de ellos se realizaron biopsias durante varias fases del ciclo menstrual, tanto en ciclos naturales como en ciclos estimulados, en las mismas pacientes (se tomaron en cuenta las pacientes que respondieron moderadamente al tratamiento para evitar variación entre individuos) y demostraron que sólo el 46% de los genes regulados al alza durante la receptividad endometrial son compartidos entre los ciclos con estimulación ovárica y los ciclos naturales, lo que indica que la superovulación regula la activación transcripcional de otros genes que no están involucrados en la receptividad fisiológica normal del endometrio. Además, algunas funciones biológicas involucradas en vías de señalización como la del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* : TGF $\beta$ ), la migración transendotelial de

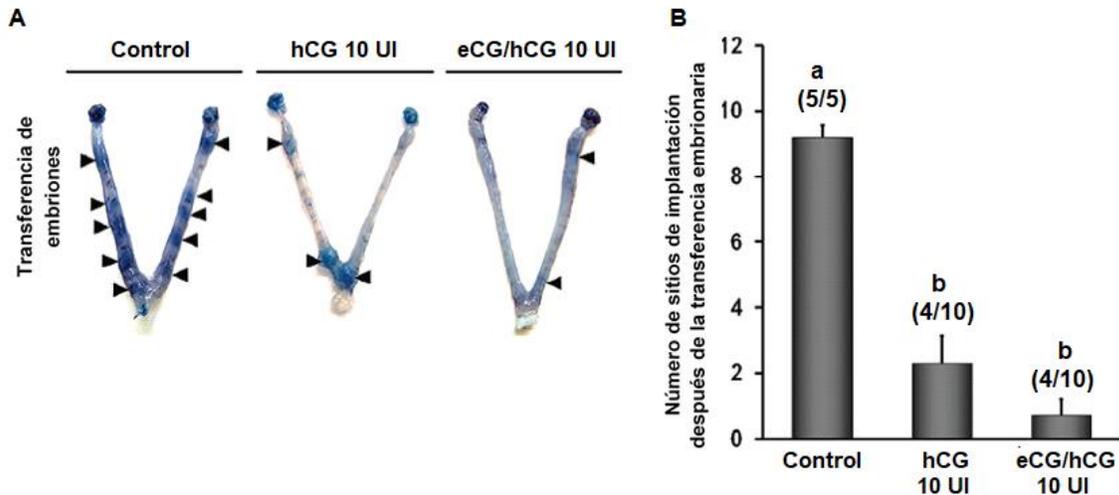
leucocitos y las cascadas de coagulación, que se encuentran activas en ciclos naturales, no se encuentran en los ciclos de estimulación hormonal, lo cual sugiere que el tratamiento con gonadotropinas modifica algunas vías de regulación transcripcional. La mayoría de los genes que no están desregulados en los ciclos estimulados se encuentran relacionados con las funciones del ciclo celular, por ejemplo, en las transiciones de los estadios G1/S y G2/M y en el monitoreo de la integridad del ADN. De este modo se infiere que el tratamiento con gonadotropinas altera al endometrio durante la ventana de implantación, dando como resultado fallas en ésta (Haouzi *et al.* 2009).

Por otro lado, en el ratón, un importante modelo en diferentes áreas de la investigación biomédica, se han hecho numerosos estudios sobre la biología de la reproducción y la biología del desarrollo. En uno de ellos, realizado en 2001 por Ertzeid y Storeng, se cultivaron embriones en etapa de 2 a 4 células provenientes de hembras superovuladas (SO) y de hembras no superovuladas, éstos se transfirieron en etapa de mórula compacta, blastocisto temprano y/o expandido a cuernos diferentes de una misma hembra receptora SO o a cuernos diferentes de una misma hembra receptora no SO, con el objetivo de evaluar si había alteraciones en los ovocitos, en el desarrollo de los embriones y/o en el medio uterino como consecuencia de la estimulación gonadótropa. Como resultado, se registró un mayor número de embriones provenientes de hembras control que eclosionaron en comparación con los embriones provenientes de hembras SO y una tasa de implantación mucho más baja de embriones provenientes de hembras SO en comparación con la de los embriones provenientes de hembras control que fueron transferidos a hembras control. También observaron un peso bajo en los fetos y un crecimiento retardado de éstos, lo cual podría indicar que la superovulación afecta el desarrollo embrionario peri implantación y/o post implantación, asimismo, se reportó una mayor tasa de implantación de embriones provenientes de hembras control transferidos a hembras control en comparación con los transferidos a hembras SO y una mayor tasa de mortalidad post-implantación de embriones provenientes de hembras SO que se transfirieron a hembras SO en comparación con los transferidos a hembras control. Todo esto indica que la estimulación con gonadotropinas afecta negativamente al útero, alterando su capacidad de implantación. En cuanto a la mortalidad post-implantación, no hubo diferencias significativas entre embriones de donadoras control y de donadoras SO trasferidos a hembras control, ni tampoco transferidos a hembras SO, lo que nos pudiera decir que el daño en el útero causado por la

estimulación gonadotrópica es más evidente durante la implantación embrionaria. (Ertzeid y Storeng, 2001).

Como se mencionó, la estimulación ovárica se realiza mediante un tratamiento doble y se ha observado que esto puede causar daños al endometrio, incluso utilizando el tratamiento con sólo una de estas hormonas (Ezoe *et al.* 2014). Ezoe y colaboradores reportaron un número significativamente menor de sitios de implantación en las hembras de los grupos en donde se utilizó una sola hormona a concentración alta (10 UI, Unidades Internacionales) y en grupos donde se utilizaron ambas hormonas a concentraciones altas en comparación con las del grupo control, además la separación de los sitios de implantación fue anormal (Fig. 8 B y A). Se observó también en los grupos con tratamiento doble, que los blastocistos se encontraban en la luz del epitelio luminal (ELu) haciendo apenas contacto con éste, cuando de manera normal los blastocistos se unen en el polo antimesometrial del útero, es decir, la parte del endometrio más coronal. También evaluaron la angiogénesis del estroma endometrial en los grupos mediante un marcador de células endoteliales vasculares recién formadas y se dieron cuenta que en todos los grupos tratados con hormonas hubo menos permeabilidad vascular en comparación con los grupos control, observándose que a mayor concentración de gonadotropinas mayor es la alteración de la función del epitelio luminal durante la ventana de implantación.

En otro estudio, para saber si la estimulación hormonal causa un daño post-implantación provocaron una decidualización artificial para eliminar la señal embrionaria que la induce, y notaron que en todas las hembras control se produjo exitosamente la decidualización y, por el contrario, se encontraron pocas células deciduales en las biopsias de las hembras de los grupos tratados con hormonas exógenas. Asimismo, notaron que los niveles de expresión de *Bmp2*, *Wnt4* y *Fst*, genes estrechamente relacionados con el proceso de decidualización, fueron mucho más bajos en las hembras de los grupos con tratamiento hormonal respecto a las de los grupos control, también que la secreción de estrógenos y progesterona se interrumpe en las hembras de los grupos tratados, es decir, presentan una esteroidogénesis anómala, lo que implica que las ondas sincronizadas de proliferación y diferenciación celular en el endometrio se vean afectadas (Ezoe *et al.* 2014).

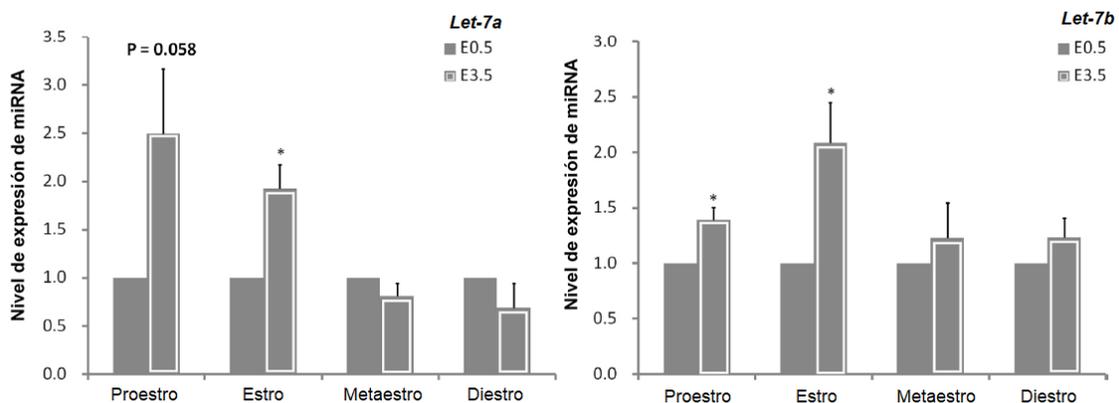


**Figura 8. Implantación defectuosa, poco espaciado entre sitios de implantación embrionaria y angiogénesis uterina en ratones estimulados previamente sometidos a transferencia embrionaria.** (A) Úteros al día 5 post coito de hembra control y de hembras estimuladas. Sitios de implantación señalados con puntas de flecha. Se observa una separación marcada entre los sitios de implantación de ratones estimulados. (B) Número de sitios de implantación al día 5 post coito. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los números sobre las barras indican el número de hembras preñadas sobre el número total de hembras. Las barras etiquetadas con letras distintas son significativamente diferentes entre sí ( $P, 0.05$ ). (Tomada de Ezoé *et al.* 2014).

Se sabe que la presencia de las isoformas del receptor a progesterona (RP) es fundamental para establecer y mantener la gestación. Los genes que codifican para éstas se encuentran transitoriamente expresados en el ELu justo antes de la implantación del embrión y durante el proceso de implantación disminuye dicha expresión. A su vez, su expresión aumenta en el estroma uterino y persiste durante la decidualización; sin embargo, en las hembras tratadas con hormonas se registró una expresión anómala de estos genes, es decir, se inhibió su expresión en el ELu durante todo el periodo peri-implantación pero en el estroma uterino sí aumentó como normalmente ocurre, lo cual resulta en defectos en la implantación (Diao *et al.* 2011). Finalmente, las cesáreas realizadas a las hembras de ratón gestantes y pseudogestantes reportaron que las tasas de embarazo de todos los grupos tratados con hormonas fueron notablemente más bajas que las de los grupos control y fueron aún más bajas en los grupos con doble tratamiento hormonal. Como consecuencia, todos estos resultados nos permiten inferir que la estimulación gonadótropa perturba severamente la función principal del ELu, que es la de controlar la inducción de la decidualización, además perturba su función durante el proceso de unión a los blastocistos y por consiguiente, compromete severamente el evento de implantación y el de decidualización. Es importante

mencionar que este daño es directamente proporcional a la concentración de gonadotropinas administradas.

Otro estudio, realizado en ratonas, determinó que la sincronización del ciclo estral innato y la administración de gonadotropinas puede optimizar la calidad de los ovocitos y, a pesar de que las tasas de embarazo son bajas en hembras tratadas en comparación con las hembras control, éstas son más altas cuando se superovula en la etapa de proestro o estro que en las etapas de metaestro y diestro. Este trabajo evaluó el desarrollo folicular ovárico, la expresión de *Muc1*, *let-7a* y *let-7b*, las tasas de embarazo y el peso de las crías (Inyawilert *et al.* 2016). Se sabe que, en condiciones normales, los miARN *let-7a* y *let-7b* tienen una expresión alta al 0.5 dpc y aún más alta a los 3.5 dpc, lo que indica que juegan un papel importante en el proceso de implantación (Fu *et al.* 2011, Inyawilert *et al.* 2015). Los resultados arrojaron que el grupo control ambos miARN aumentaron su expresión durante la fase receptiva en los grupos proestro y estro, en contraste con los grupos metaestro y diestro en los cuales no hubo un aumento. En el grupo experimental la expresión de *let-7a* disminuyó bastante al día 3.5 pc (Fig. 9), lo que podría reflejarse en una alteración en el momento de la implantación.



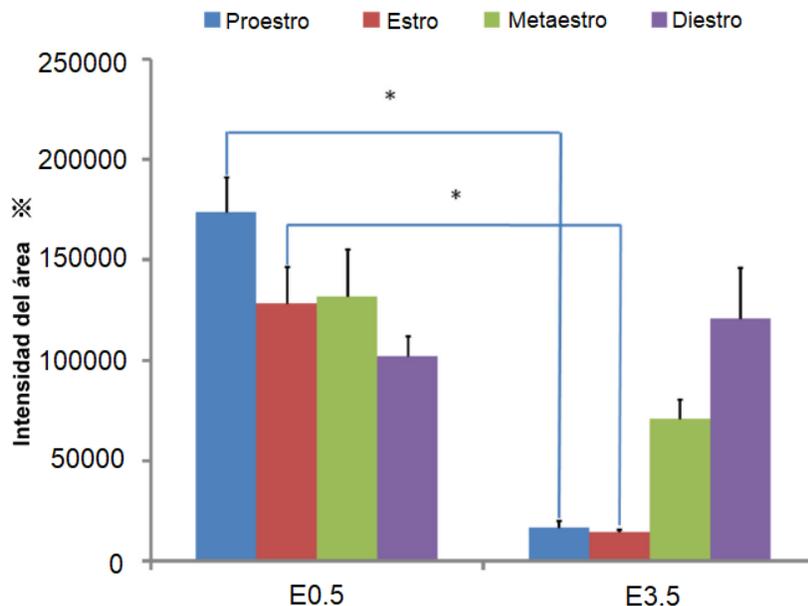
**Figura 9.** Expresión de miARN *let-7a* y *let-7b* al día 0.5 pc y 3.5 pc en células epiteliales endometriales de hembras superovuladas en cada etapa del ciclo estral. (Tomada de Inyawilert *et al.*, 2016).

También disectaron los cuernos uterinos para analizar la presencia de la proteína *Muc1* mediante inmunohistoquímica. Observaron en el grupo experimental que ésta se reduce significativamente al día 3.5 pc en las hembras en etapas de proestro y estro pero no reportaron diferencias significativas en metaestro y diestro (Fig. 10). Recordemos que la disminución de esta mucina a los 3.5 dpc es necesaria para que se lleve a cabo la

implantación del blastocisto ya que, de no suceder así, esta molécula no permitirá la adherencia del embrión al endometrio, por lo que al no disminuir su expresión durante la ventana de implantación en los grupos metaestro y diestro, se verá afectada la unión blastocisto-endometrio (Ren *et al.* 2011). Además, midieron la tasa de gestación en todos los grupos y notaron que en los de metaestro y diestro se obtuvo una considerable disminución de ésta con respecto a los grupos proestro y estro.

En conclusión, la administración de hormonas exógenas en la etapa de estro produce un mejor resultado en cuanto al desarrollo endometrial, calidad de los ovocitos y peso de las crías, mientras que en metaestro produce el peor resultado, probablemente debido, en gran parte, a que en proestro y estro se encuentran numerosos folículos grandes preovulatorios lo suficientemente maduros para ser ovulados tras la inyección de hCG, mientras que en metaestro y diestro ya se ven claramente los cuerpos lúteos que han dejado los folículos ovulados en proestro, por lo tanto el número de ovocitos ovulados en estas hembras fue mucho menor que en las superovuladas en proestro y estro, además un alto porcentaje de ovocitos fue encontrado sin cúmulos, ovocitos con un cuerpo polar fuera de ellos y ovocitos con agregados mitocondriales dentro de su citoplasma (Inyawilert *et al.* 2016).

Aunque los mejores resultados se obtuvieron de éste grupo de animales, los reportes de Ertzeid y Storeng, 2001; Boroujeni *et al.* 2010 y Huffman *et al.* 2015, muestran que el uso de gonadotropinas exógenas para los tratamientos de RA traen como consecuencia una mortalidad fetal post-implantación significativamente mayor al de las hembras no tratadas, compromete la funcionalidad endometrial y los blastocistos presentan alteraciones; además, el tratamiento afecta al desarrollo de los folículos ováricos (Inyawilert *et al.* 2016), por consiguiente en éstas hembras existe una tasa de embarazo menor que en las hembras no tratadas hormonalmente.



**Figura 10.** Análisis cuantitativo de la expresión de Muc1 al 0.5 dpc y a los 3.5 dpc en las diferentes etapas del ciclo estral. (Tomada de Inyawilert *et al.*, 2016).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los ratones han servido como un modelo animal importante para estudiar la regulación de las funciones uterinas mediadas por hormonas como progesterona y estrógenos, sin embargo, los modelos existentes se enfocan en reproducir patologías como el cáncer o la endometriosis y los que pueden reproducir la infertilidad por falla sostenida de la función endometrial han dado como resultado determinaciones a corto plazo, por lo que es desconocido aún si dichas alteraciones se mantienen y/o afectan a mediano y largo plazo la función endometrial. En la actualidad existe poca información contundente sobre el impacto de la estimulación ovárica, mediante la administración de hormonas exógenas, sobre la función endometrial y el desarrollo del embrión humano y son pocos los modelos que existen para poder estudiar las patologías asociadas a ello, hecho que complica la recolección de datos que pudieran ayudar a entender de mejor manera los factores que regulan la implantación y cómo pueden verse desregulados.

Por lo anterior, es importante establecer bases que nos permitan dilucidar los efectos a mediano y largo plazo sobre la función endometrial causados por la exposición a niveles hormonales suprafisiológicos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La superovulación afectará de manera negativa la funcionalidad endometrial a mediano plazo en ratones C57BL/6.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto a mediano plazo de la superovulación sobre la funcionalidad endometrial en ratones C57BL/6.

##### **5.1 Objetivos particulares**

- Estandarizar el método de superovulación en la cepa de ratón C57BL/6.
- Determinar el efecto de la superovulación sobre la producción de ovocitos viables.
- Evaluar el efecto de la superovulación sobre la capacidad de implantación del endometrio.
- Determinar el efecto de la superovulación sobre las tasas de nacimientos.

#### **6. MATERIALES Y MÉTODO**

##### **6.1 Animales**

Se usaron hembras de la cepa C57BL/6 de 8 a 9 semanas de edad y machos de la cepa CD1 de 12 a 15 semanas de edad proporcionados por la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura y bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad, abastecidos de agua y comida *ad libitum*. Los sacrificios se llevaron a cabo mediante dislocación cervical con todas las normas de cuidado establecidas por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas – UNAM y siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999.

Los animales que fueron inyectados vía intravenosa fueron anestesiados previamente vía intraperitoneal con ketamina-xilacina (500 µl de ketamina, 250 µl xilacina y 4250 µl de solución salina estéril), en una dosis de 0.1 ml por cada 10 g de peso.

##### **6.2 Citologías**

Las inyecciones hormonales y las de solución salina se realizaron cuando las hembras se encontraban en la fase de proestro. Para determinar la fase del ciclo se realizaron citologías vaginales y la fase de proestro se determinó mediante la predominancia de células

epiteliales nucleadas, aunque también pueden encontrarse algunas células cornificadas (Caligioni, 2009).

Para la realización de las citologías vaginales se lavó la vagina con la ayuda de una micropipeta 200  $\mu$ l y su respectiva punta. Tomando de 35  $\mu$ l a 40  $\mu$ l de solución salina (NaCl 0.9%) se insertó cuidadosamente 1/4 parte de la punta en la vagina y se realizó el lavado dejando el líquido dentro de la vagina y recogiéndolo nuevamente con la misma micropipeta de 2 a 3 veces, después el líquido se colocó sobre un portaobjetos, se le colocó un cubreobjetos y se observó bajo el microscopio estereoscópico.

### **6.3 Superovulación**

Se realizaron dos grupos de hembras, uno con 9 ratonas (3 por cada experimento) que recibió inyecciones de NaCl 0.9% y el otro con 18 ratonas, que recibió un tratamiento hormonal siguiendo el mismo protocolo. Éste último grupo a su vez se dividió en dos, 9 hembras que se pusieron a monta inmediata y las 9 restantes que se pusieron a monta una semana después del tratamiento (3 por cada experimento).

El esquema de inyección se realizó con base en Vasegui *et al.* 2017: se administró vía intraperitoneal una inyección de 0.2 ml con 10 UI de Folligon® (hormona Gonadotropina Coriónica equina 1500 UI/1 mL) diluidas en solución salina a las 13:30 h del día 1 y 48 h después una inyección vía intraperitoneal de 0.2 ml con 10 UI de Chorulon® (Gonadotropina coriónica humana 1000 UI/ 1 mL) diluidas en solución salina. El stock de hormonas es almacenado a una temperatura de -20° C.

A las hembras que no fueron superovuladas se les administraron 0.2 ml de solución salina vía intraperitoneal siguiendo el mismo esquema que las hembras tratadas con hormonas.

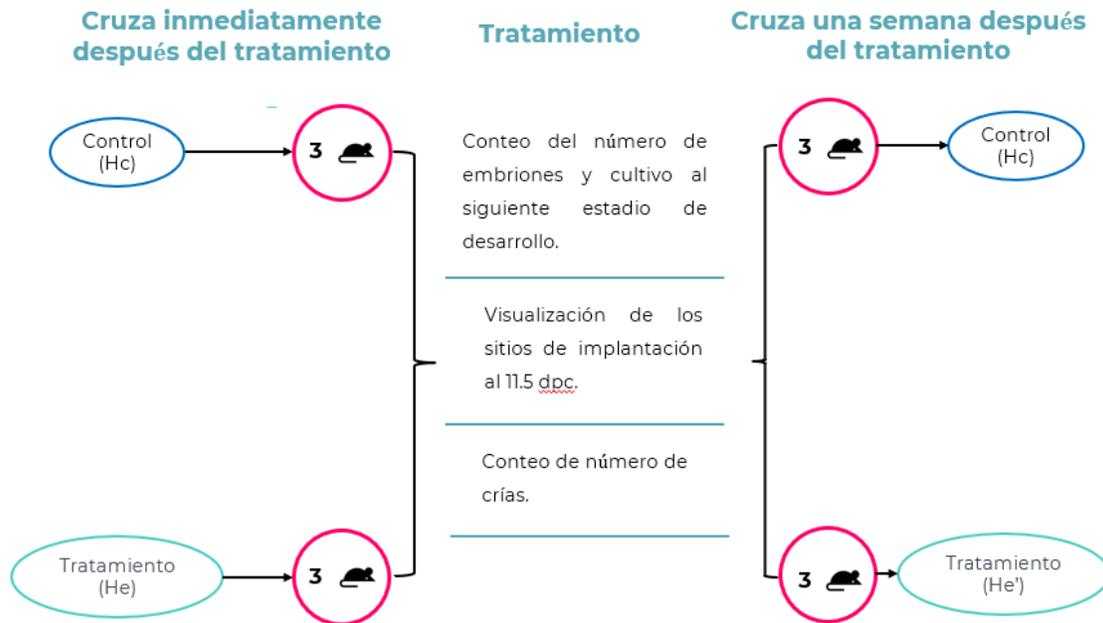
### **6.4 Grupos experimentales**

Después de la segunda inyección, ya sea de hormona o solución salina, las hembras fueron divididas como se muestra en la Figura 11. Al día siguiente de la cruce se corroboró la monta mediante la presencia del tapón vaginal.

### **6.5 Obtención de cigotos y cultivo**

Para cada hembra se preparó una caja de Petri con cuatro gotas de medio de cultivo de embriones M16 (Sigma-Aldrich) embebidas en aceite mineral (Sigma-Aldrich), éstas se pre-incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> durante al menos media hora junto con una alícuota con

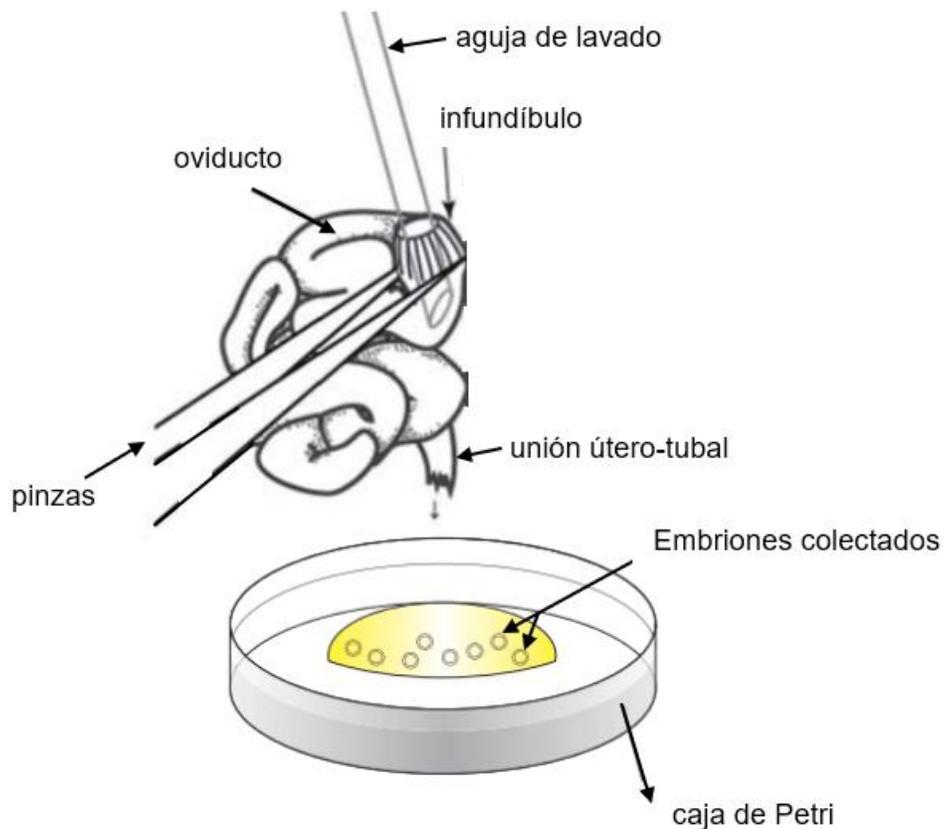
0.4 ml de medio M2 (Sigma-Aldrich), que es un medio utilizado para mantener los embriones fuera de la incubadora durante manipulaciones prolongadas (Behringer et al. 2014 y Carter, 1993).



**Figura 11.** Esquema con los tratamientos respectivos de cada grupo experimental y del grupo control. n= 3 por cada tratamiento.

Después del sacrificio de las hembras al 1.5 dpc se les realizó un corte en la piel del área abdominal justo a la altura donde comienzan sus piernas, con los dedos índice y pulgar de una mano se sujetó firmemente la piel arriba de la incisión y con los mismos dedos de la otra mano se sujetó debajo de la incisión para tirar firmemente hacia la cabeza y hacia la cola con el fin de exponer completamente el área abdominal, después se hizo un corte en el peritoneo para exponer el aparato reproductivo; con unas microtijeras, se hizo un corte por arriba del ovario y por debajo del oviducto recuperando parte del cuerno uterino, se separó del mesometrio y se colocó esta porción en una caja de Petri. Para la técnica de *flushing* (Fig. 12) se utilizó una jeringa hipodérmica con una aguja de 30 a 32 g (BD) con el bisel limado para evitar daños al oviducto, ésta fue cargada con 0.2 ml de medio M2 previamente incubado. Sobre una caja Petri se introdujo la aguja en el oviducto a través del infundíbulo y haciendo pasar los 0.2 ml del medio se obtuvieron los embriones en diferentes estadios.

Los embriones se tomaron con una pipeta de boca y se colocaron en una gota de medio M16, éstos fueron incubados algunas horas, posteriormente se hicieron pasar por las tres gotas restantes de M16 para deshacerse del *debris* celular y se dejaron incubando toda la noche. Al día siguiente bajo el microscopio se contabilizó el número de embriones que se desarrollaron al siguiente estadio embrionario para obtener el porcentaje de embriones viables.



**Figura 12. Flushing.** Técnica para “lavar” los oviductos mediante el flujo de un medio adecuado y así obtener los embriones dentro de éstos (Modificado de Nakagata, 2015).

### 6.6 Visualización de los sitios de implantación del embrión

Se pesó a cada hembra gestante a los 11.5 dpc para determinar la dosis de anestesia adecuada, posteriormente se anestesió la hembra y se le colocó la cola dentro de un tubo con agua a 60°C para dilatar sus venas caudales, inmediatamente se inyectó 0.1 ml del colorante Chicago Sky Blue 6B (Sigma-Aldrich) al 1% a través de una de sus dos venas laterales caudales utilizando una jeringa de 1 ml con un agujero de calibre 27 g (BD) y al terminar, se hizo presión en el lugar de la inyección para parar el sangrado.

La hembra se sacrificó 3 minutos después de la inyección mediante dislocación cervical, con unas tijeras de disección se realizaron los cortes descritos previamente para exponer completamente el área abdominal y abrir el peritoneo. Una vez localizados los cuernos uterinos se jalaban un poco y se expusieron los ovarios, se hizo un corte entre el ovario (en ambos ovarios) y la bolsa de grasa que se encuentra por encima de éste y se extrajo el útero completo para después colocarlo sobre una caja Petri. Los sitios de implantación se tiñeron de azul.

### **6.7 Contabilización del número de crías**

Se contabilizaron las crías obtenidas de cada hembra y se obtuvo el promedio de número de crías por experimento.

### **6.8 Análisis estadístico**

Los datos presentan una distribución normal y fueron analizados mediante la prueba t de *student*. Se tomó como diferencia significativa una  $p \leq 0.05$ .

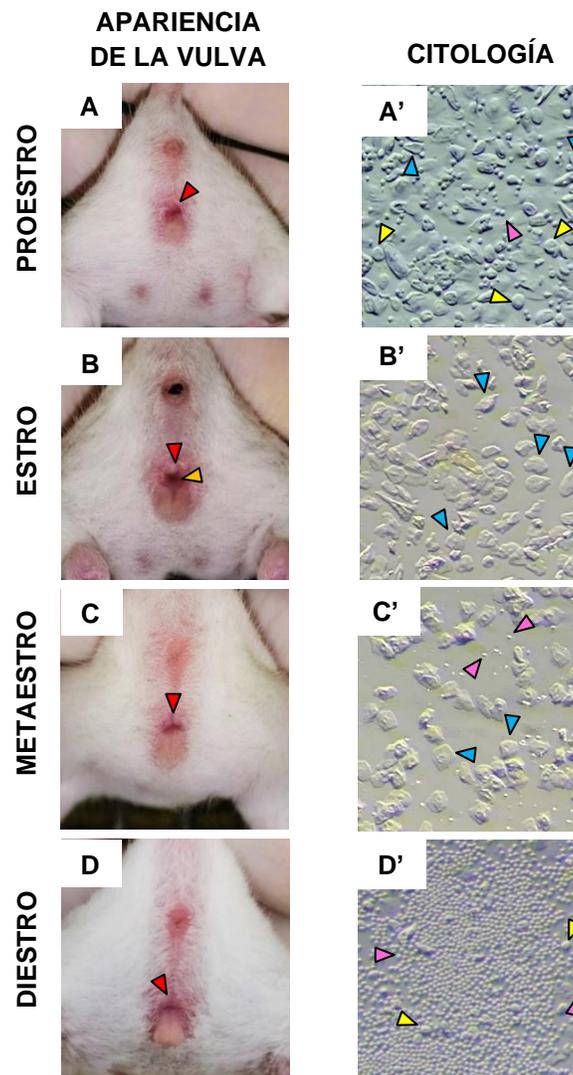
## **7. RESULTADOS**

Para disminuir la posible variabilidad del efecto del tratamiento con gonadotropinas, se decidió no usar hembras en distintas etapas del ciclo estral, además la superovulación durante el proestro ha mostrado mejorar la calidad de los ovocitos (Inyawilert *et al.* 2016), es por esto que la primera inyección de gonadotropinas se hizo durante esta fase. Se observaron las apariencias de las vulvas y se realizaron citologías vaginales para determinar con mayor precisión la fase del ciclo estral en donde se encontraban las hembras (Fig. 13) y así llevar un registro del ciclo de cada una de ellas.

### **7.1 La superovulación no afecta a mediano plazo al número de embriones obtenidos ni al desarrollo temprano de éstos**

Se observó que la superovulación afectó de manera positiva el número de ovocitos recuperados de las hembras superovuladas y puestas a cruce inmediata (He), ya que se obtuvo un promedio de embriones alto en comparación con el grupo no tratado, sin embargo, en las hembras puestas a cruce una semana después de la superovulación (He') se obtuvo un promedio de embriones parecido al obtenido de las hembras control (Hc). De la Hc1, es decir, de la hembra control 1, se obtuvo un total de 7 embriones (1 cigoto y 6 embriones de dos células) y al cultivar estos embriones durante un día (Fig.14A), se observó

que 6 de éstos habían logrado desarrollarse al siguiente estadio embrionario. Para obtener el porcentaje de embriones viables se tomó el número de embriones obtenidos como el 100%, así que se multiplicó el número de embriones desarrollados por el 100% y el resultado se dividió entre el número de embriones obtenidos, el porcentaje de viabilidad embrionaria de la Hc1 fue de 85.71%. Cabe mencionar que debido a la asincronía entre los procesos de ovulación y de fecundación de los ovocitos cuando éstos ocurren de manera natural (diferencia de horas), los embriones obtenidos de las hembras mediante la técnica de *flushing* 48 h después de la cruce, se encontraron en diferentes estadios de desarrollo (Fig. 14A).



**Figura 13. Ciclo estral del ratón.** (A) Apariencia de la vulva durante la fase de proestro. Los labios comienzan a engrosarse adquiriendo tonos rosados (flecha roja) y el orificio vaginal se encuentra ligeramente dilatado. (A') Citología vaginal durante la fase de proestro. Hay una gran cantidad de células nucleadas pequeñas y redondeadas (flechas amarillas), algunas ya se encuentran cornificadas (flechas azules) y aún pueden

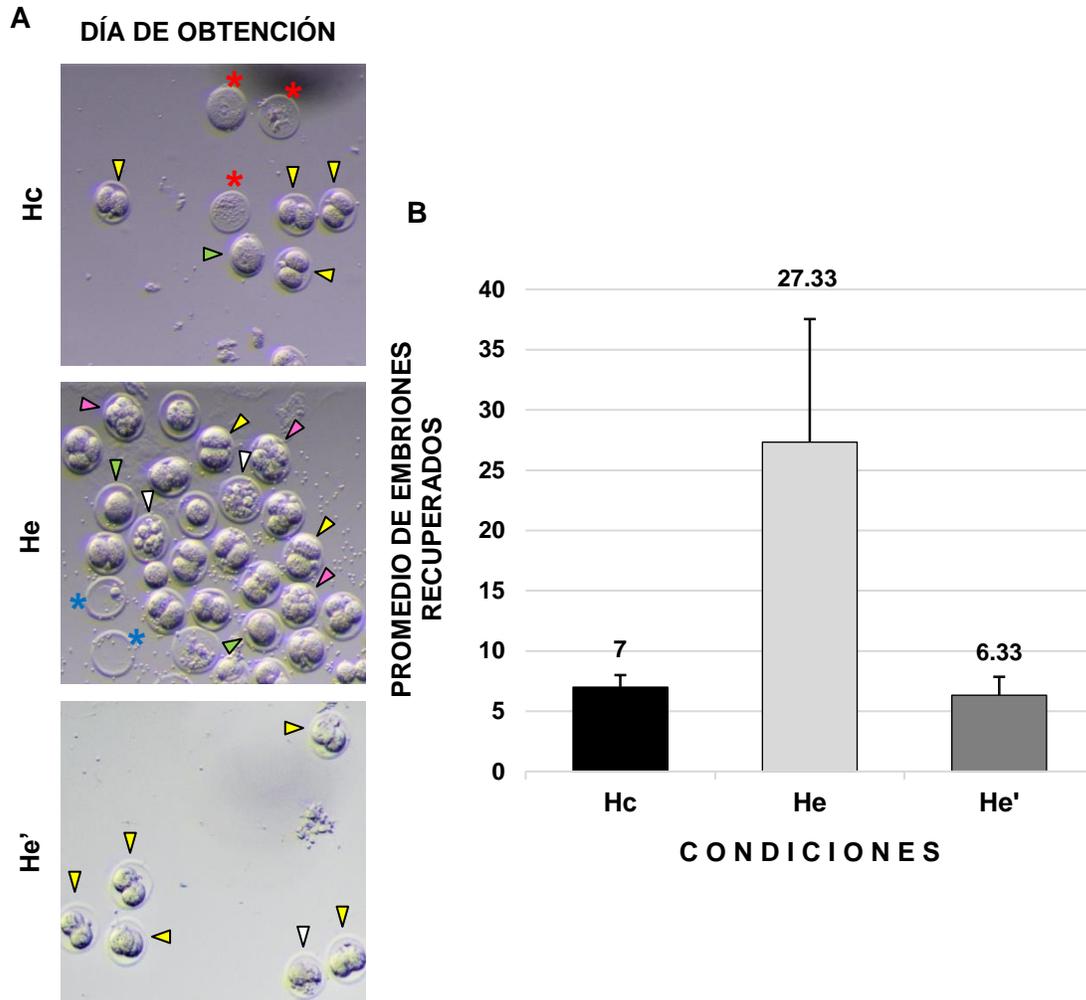
observarse unos pocos leucocitos (flecha rosa). **(B)** Apariencia de la vulva durante el estro. Se observan los labios engrosados y de un color rosado brillante (flecha roja), además, la apertura de la vagina es amplia (flecha naranja). **(B')** Citología vaginal en estro. Se encuentran muchas células epiteliales cornificadas (flechas azules), es decir, células de forma irregular con núcleo degenerado y sin organelos. **(C)** Apariencia de la vulva en metaestro. Los labios están ligeramente engrosados (flecha roja), se aprecia cómo es que van perdiendo turgencia y toman un color rosado más pálido. **(C')** Citología vaginal durante el metaestro. Se observan aún células epiteliales cornificadas (flecha azul) y comienza la invasión de glóbulos blancos que eliminan las células muertas, por lo que se observan además restos celulares y leucocitos (flechas rosas). **(D)** Apariencia de la vulva en diestro. Los labios no se observan engrosados (flecha roja) y el orificio de la vagina se encuentra bastante estrecho. **(D')** Citología vaginal en diestro. Se puede observar una gran cantidad de leucocitos (flechas rosas) y algunas células epiteliales nucleadas (flechas amarillas).

De la Hc2 se obtuvo un total de 8 embriones (3 embriones de dos células y 5 embriones en más de 4 células), al día 1 de cultivo se observaron 7 embriones desarrollados al siguiente estadio (3 embriones en más de cuatro células, 2 embriones sin ZP fusionados y 2 mórulas compactas), su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 87.5%. De la Hc3 se obtuvo un total de 6 cigotos, tras 24 h de cultivo, 2 embriones se encontraban en dos células y 4 embriones en cuatro células, por lo tanto, su porcentaje de viabilidad embrionaria fue del 100%.

En las hembras puestas a cruce inmediatamente después de la superovulación (He) se obtuvo el mayor número de embriones que en el resto de los grupos; de la He1 se obtuvo un total de 39 embriones (10 cigotos, 22 embriones de dos células y 7 embriones de más de dos células), éstos se cultivaron una noche y se observaron nuevamente bajo el microscopio, y se contabilizaron 33 embriones que lograron desarrollarse al siguiente estadio embrionario, por lo que su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 84.61%. De la He2 se obtuvo un total de 20 embriones, un día de cultivo después 14 de estos embriones se habían desarrollado al siguiente estadio; su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 70%. De la He3 se obtuvo un total de 23 embriones, después de cultivarlos un día, 20 de ellos se habían desarrollado al siguiente estadio; su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 86.95%.

El análisis de datos arrojó que para las medias de los embriones obtenidos de los grupos Hc y He se obtuvo una diferencia significativa ( $p=0.02$ ), es decir, el grupo He obtuvo un mayor número de embriones obtenidos respecto al grupo Hc (Fig. 14B), lo cual nos indica que la superovulación (SO) tiene un efecto positivo en la producción del número de ovocitos. Para el porcentaje de embriones viables de estos dos grupos no existe una diferencia

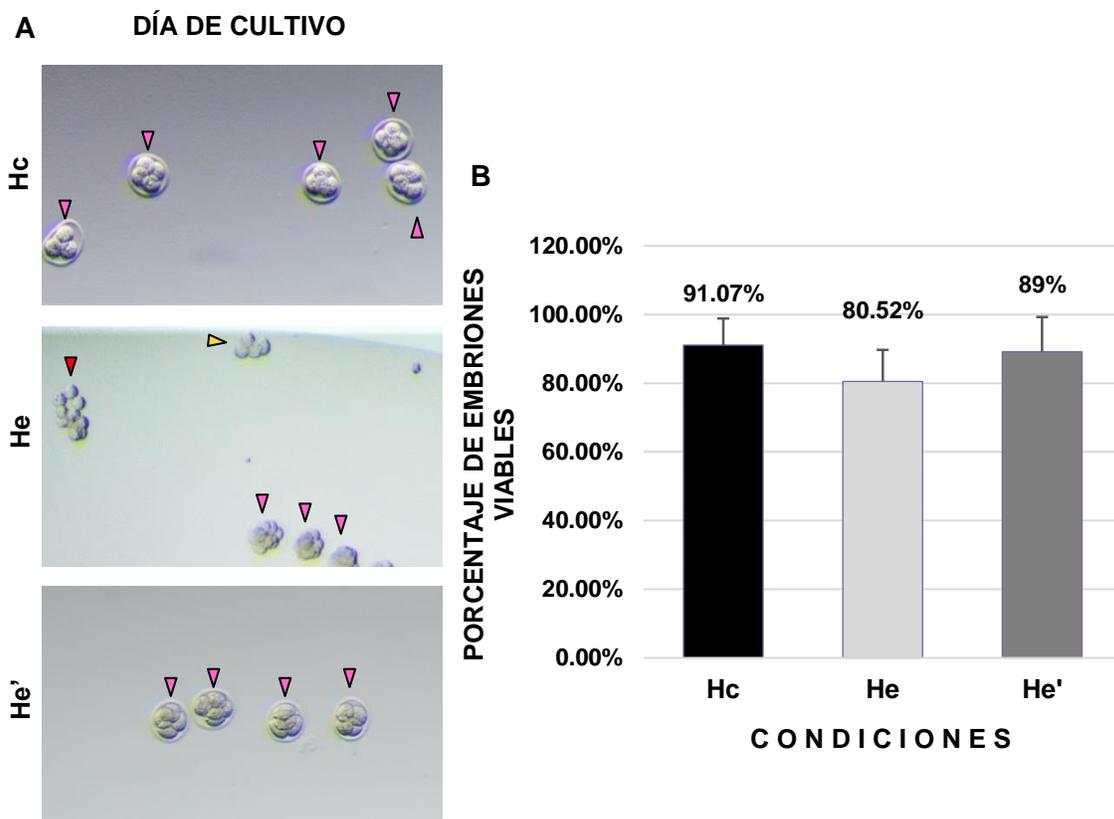
significativa ( $p=0.20$ ) (Fig. 14B), esto podría indicar que la SO no afecta al desarrollo embrionario pre-implantatorio.



**Figura 14. La superovulación no afecta el número de embriones obtenidos en hembras puestas a cruzar una semana después del tratamiento. (A)** Los embriones se obtuvieron aproximadamente a los 1.5 dpc mediante la técnica de *flushing* y se contabilizaron. Hc: Embriones obtenidos de una hembra control. Se pueden observar embriones en dos células (flechas amarillas), un cigoto (flecha verde), y algunos ovocitos (\*). He: Embriones obtenidos de una hembra puesta a cruzar inmediatamente después de la superovulación. En la imagen se observan algunos cigotos (flechas verdes), embriones de 2 células (flechas amarillas) y otros de 4 o más células (flechas rosas), cabe mencionar que algunos de estos embriones se hallaron sin ZP; también se pueden observar ZP sin embrión (\*) y embriones degenerados (flecha blanca). He': Embriones obtenidos de una hembra puesta a cruzar una semana después de la superovulación. Se pueden observar algunos embriones de 2 células (flechas amarillas) y un embrión degenerado (flecha blanca). **(B)** Promedio de embriones recuperados. En el grupo He se obtuvo un promedio significativamente mayor de embriones obtenidos respecto a las Hc. En los promedios de los grupos He' y Hc no se encuentra una diferencia significativa.  $n=3$ . ( $p \leq 0.05$ ).

De las He' se obtuvo el promedio de embriones recuperados más bajo de los tres grupos, de la He1' se obtuvo un total de 5 embriones de dos células, al día 1 de cultivo se observaron 4 embriones de cuatro y más de cuatro células; su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 80% (Fig. 15). De la He2' se obtuvo un total de 6 embriones de dos células y cuatro células, aproximadamente 24 h después del cultivo se observaron y su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 100% (Fig. 15). De la He3' se obtuvieron 8 embriones y al día de cultivo se observaron 7 embriones viables, por lo tanto, su porcentaje de viabilidad embrionaria fue de 87.5%.

En los promedios de embriones recuperados de las He' respecto a las Hc no se encontró una diferencia significativa ( $p=0.56$ ), es decir, en este estudio no se encontró evidencia de que la superovulación tenga algún efecto negativo a mediano plazo sobre el número de ovocitos producidos. Para el porcentaje de embriones viables de estos dos grupos se obtuvo una  $p=0.80$ , lo cual nos indica que para este estudio no hay evidencia de que la SO afecte a mediano plazo el desarrollo embrionario pre-implantatorio.



**Figura 15. La superovulación no afecta al desarrollo de embriones provenientes de hembras puestas a cruza una semana después del tratamiento. (A)** Los embriones obtenidos se cultivaron durante 24 h. Hc: Embriones cultivados de una hembra control. Se observan 6 embriones (flechas rosas) en 4 o más células. He: Embriones cultivados de una hembra puesta a cruza inmediatamente después del tratamiento. Pueden observarse embriones en más de 4 células (flechas rosas), 2 embriones sin ZP fusionados (flecha roja), algunos embriones degenerados (flechas blancas) y un embrión en más de cuatro células sin ZP (flecha naranja). He': Embriones cultivados de una hembra puesta a cruza una semana después del tratamiento. Cuatro de los cinco embriones obtenidos lograron desarrollarse (flechas rosas) a los estadios de 4 o más células. **(B)** Promedio de embriones viables. El porcentaje de embriones viables de las He es menor al de las Hc pero no es significativo. No se observa una diferencia significativa entre el promedio de embriones desarrollados de las He' y las Hc. n= 3. ( $p \leq 0.05$ ).

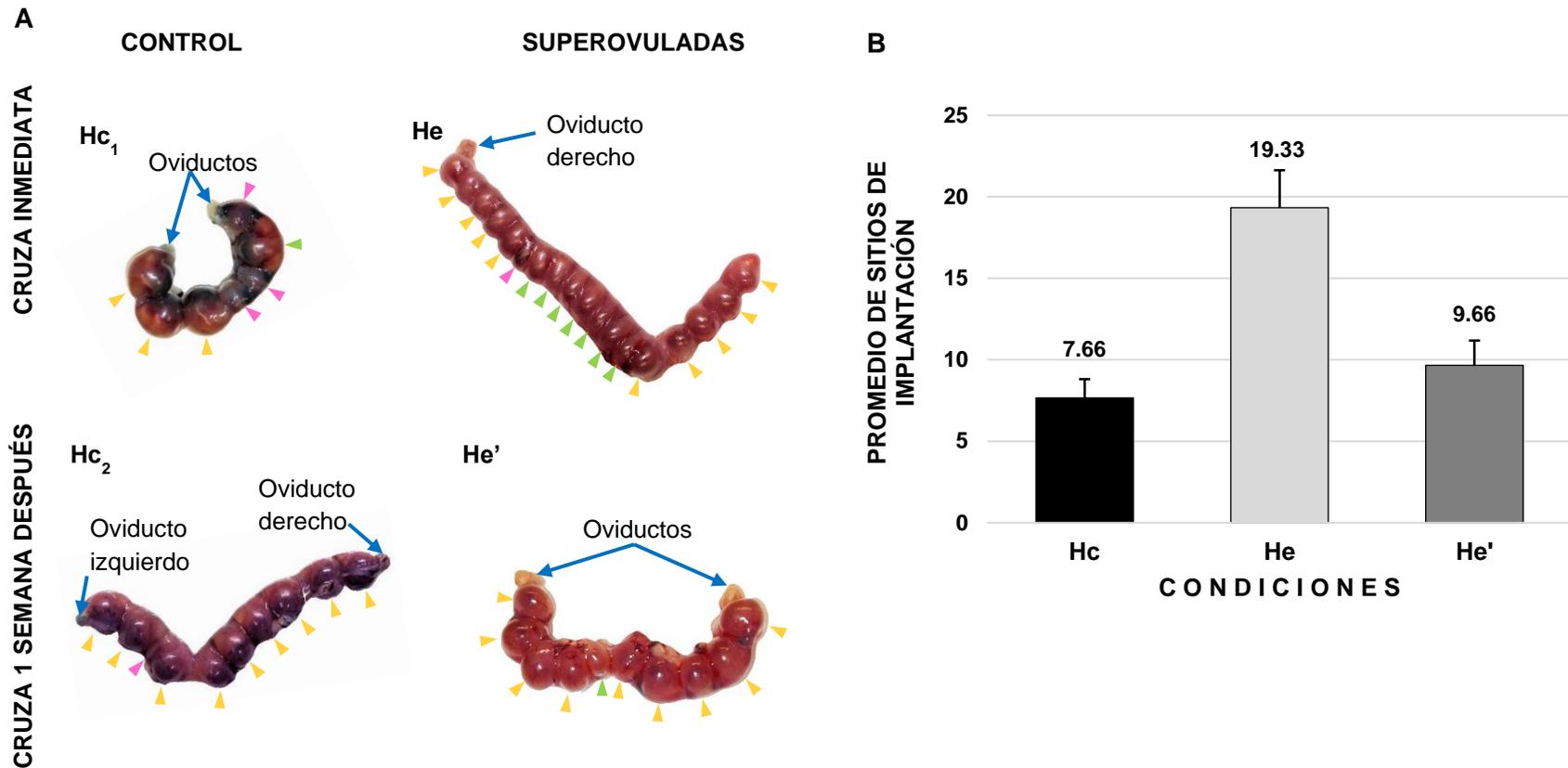
## **7.2 La superovulación no afecta a mediano plazo al número de sitios de implantación observados en el endometrio**

En la literatura se menciona que a los 7 dpc se pueden observar posibles sitios de reabsorción de embriones en los cuernos uterinos (Flores *et al.* 2014), sin embargo, decidimos extraer el útero a los 10.5 y 11.5 dpc, como se describe en la metodología, para poder observar de mejor manera los embriones que se encontraran en proceso de reabsorción, Jubb y colaboradores (2007) definen este proceso como la muerte prenatal seguida de la degeneración posterior y la reabsorción completa del concepto.

En los úteros de algunas hembras pudimos observar sitios de reabsorción sin importar si eran del grupo control o del grupo experimental. En las Hc se obtuvo el útero a los 11.5 dpc (Fig.16A), en la Hc1 se visualizaron 7 sitios de implantación, de éstos, 3 embriones tuvieron un tamaño idéntico y regular al momento de la disección del útero, un embrión se encontró más pequeño y menos desarrollado a simple vista y los tres restantes estaban en proceso de reabsorción. En la Hc2 y Hc3 se pudieron visualizar 7 y 9 sitios de implantación respectivamente sin ningún sitio de reabsorción. En las He se obtuvo el útero al 10.5 dpc y se observó un mayor número de embriones en las tres ratonas con respecto a las hembras del grupo control. Dos hembras del grupo He tuvieron 18 sitios de implantación cada una, en la He1 se pudo observar un embrión con coloración más violeta que rosada, lo cual podría indicar un sitio de reabsorción por su tamaño y por el edema que muestra al interior de sus membranas (Fig. 16A); en la He2 no se encontró ningún sitio de reabsorción al día de la obtención del útero. En la He3 se visualizaron 22 sitios de implantación de los cuales en dos de ellos los embriones se encontraban en proceso de reabsorción. Para los grupos descritos anteriormente (Hc y He) se obtuvo una  $p=0.001$ , por lo que podemos concluir que

la SO tiene un efecto positivo sobre el endometrio en el momento de la implantación (Fig.16B).

En las He' se obtuvieron los úteros a los 11.5 dpc. En la He'1 se observaron 10 sitios de implantación de los cuales un embrión era visiblemente más pequeño que el resto, lo cual podría indicar un retraso en su crecimiento, en la He'2 se visualizaron 8 sitios de implantación con un sitio de reabsorción. Por último, se visualizaron 11 sitios de implantación en la He'3. Para los grupos Hc y He' se obtuvo una  $p=0.5$ , lo cual nos podría indicar que la SO no afecta a mediano plazo la función endometrial al momento de la implantación (Fig. 16B).



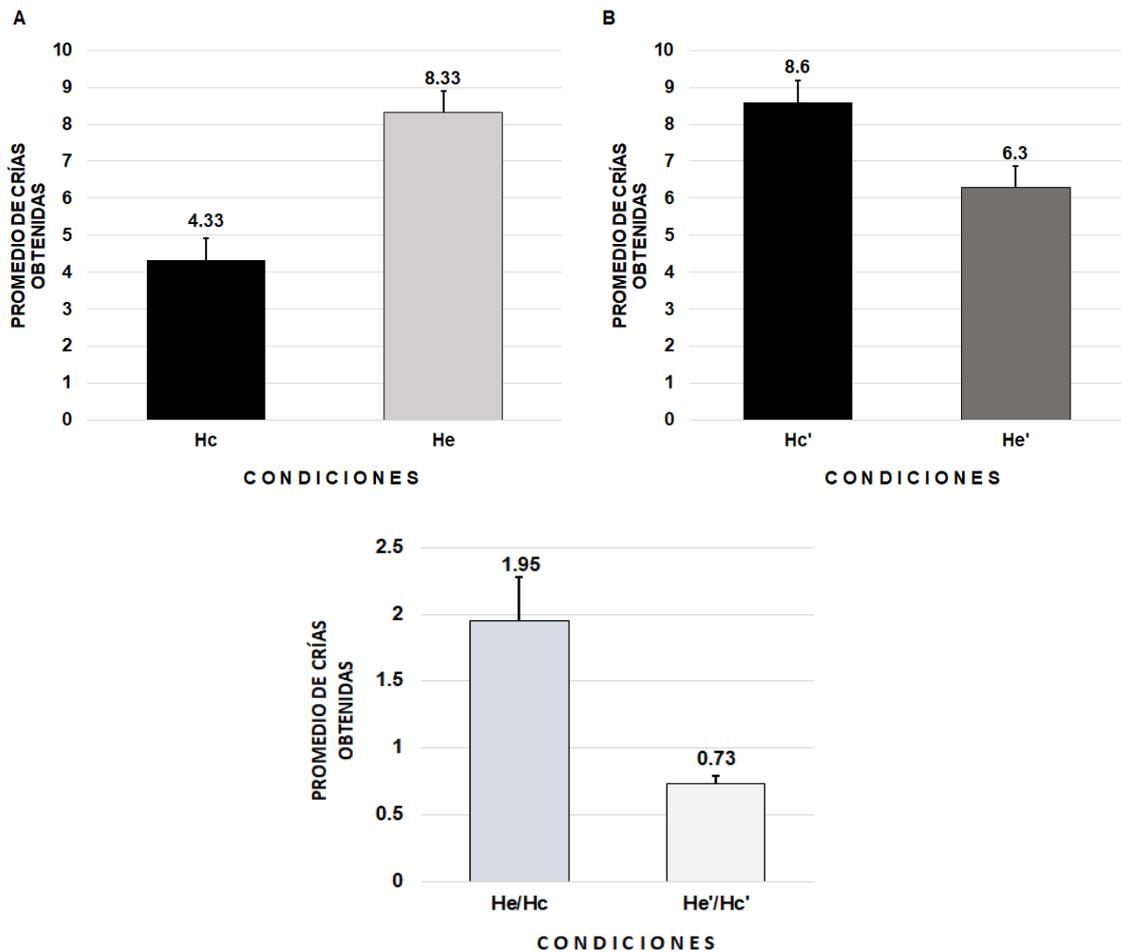
**Figura 16. La superovulación no afecta a mediano plazo al número de sitios de implantación (A)** Los úteros se obtuvieron a los 11.5 dpc. Hc<sub>1</sub>: En el cuerno derecho se pueden observar dos embriones que indican dos sitios de implantación y 5 en el cuerno izquierdo; las flechas amarillas indican sitios de implantación en donde los embriones se están desarrollando adecuadamente, la flecha verde indica el sitio de implantación con un embrión de tamaño más pequeño, las flechas violetas indican la reabsorción de embriones en etapas avanzadas. Hc<sub>2</sub>: En el cuerno uterino derecho se pueden observar 4 embriones (flechas amarillas), uno de ellos se muestra como un evidente sitio de reabsorción (flecha violeta), el cuerno uterino izquierdo tiene 6 sitios de implantación. He: El útero se obtuvo a los 10.5 dpc; en el cuerno derecho se observan 14 embriones (flechas amarillas) de los cuales 7 de ellos, indicados con la flecha verde, se visualizan más pequeños y con

una coloración un poco más violeta que el resto. Uno de los 14 embriones de este cuerno (flecha violeta) se encontró en evidente proceso de reabsorción. Seis embriones del cuerno derecho y 4 del cuerno izquierdo se visualizan de buen tamaño, más redondeados y de color más rosado (flechas amarillas). He': Se encontraron 5 sitios de implantación en cada cuerno uterino, un embrión (flecha verde) se observa evidentemente más pequeño que el resto de los embriones, lo que podría indicar el inicio de la reabsorción de éste. **(B)** Porcentaje de sitios de implantación respecto al promedio de embriones obtenidos. En las He se obtuvo un promedio significativamente mayor de sitios de implantación de embriones respecto a las Hc, en las He' hubo una disminución en los sitios de implantación respecto a las Hc, sin embargo, no existe diferencia significativa. n= 3. ( $p \leq 0.05$ ).

### **7.3 La superovulación afecta negativamente a mediano plazo al número de crías obtenidas**

En contraste con algunos estudios realizados previamente (Van der Auwera y D'Hooghe, 2001; Ertzeid y Storeng, 2001) en donde se menciona que la SO afecta al número de crías obtenidas, este estudio muestra que las He tuvieron en promedio el doble de crías que las Hc puestas a cruce con machos CD1. La He1 y la He2 tuvieron 8 crías cada una, la He3 tuvo 9 crías, mientras que la Hc1 y la Hc2 tuvieron 4 crías cada una y la Hc3 5 crías. En el análisis de datos para estos dos grupos (Hc y He) se obtuvo una  $p=0.001$ , esto nos indica que la SO afecta positivamente al número de crías obtenidas (Fig. 17A).

Las hembras puestas a cruce una semana después del tratamiento se cruzaron con machos C57BL/6, a diferencia del resto de los grupos de los diferentes experimentos, debido a que en ese momento no se contaba con machos CD1. Esto no afecta el análisis de los resultados ya que para las hembras experimentales hay un grupo control que se cruzó con machos C57BL/6 para poder comparar ambos resultados. Las He' tuvieron en promedio menos crías que las Hc puestas a cruce con machos C57BL/6, la He'1 y la He'2 tuvieron 6 crías cada una, la He'3 tuvo 7 crías, mientras que las Hc'1 y Hc'2 tuvieron 9 crías cada una y la Hc'3 tuvo 8 crías. Para estos grupos se obtuvo una  $p=0.007$ , lo cual nos indica un efecto negativo a mediano plazo de la SO sobre el número de crías obtenidas (Fig. 17B). Se realizó un cociente de cada hembra experimental (He y He') sobre su respectiva hembra control (Hc y Hc') para normalizar los resultados y analizar la existencia de diferencias entre las crías obtenidas de las He y las He', el análisis de datos arrojó una  $p=0.003$ , lo cual nos indica que las He' tuvieron un promedio de crías significativamente más bajo que las He (Fig. 17C).



**Figura 17.** La superovulación afecta negativamente al número de crías obtenidas de hembras puestas a cruza una semana después del tratamiento. **(A)** Se utilizaron hembras C57BL6. En la gráfica se observa que de las He nacieron en promedio el doble de crías que las que nacieron de las Hc. **(B)** Se utilizaron hembras CD1. La gráfica muestra que las He' tuvieron en promedio un número significativamente menor de crías respecto a las Hc. **(C)** En la gráfica se puede observar el promedio de los cocientes He/Hc y He'/Hc' por cada individuo de la n, que muestra un promedio significativamente menor del número de crías obtenidas de las He' respecto a las He. n= 3. ( $p \leq 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

La implantación es el evento mediante el cual una serie de interacciones sincrónicas moleculares y celulares crean una conexión íntima entre el blastocisto y el endometrio, por lo tanto, es un paso crítico para que el embarazo se lleve a cabo. Debido a los múltiples problemas para concebir, las tecnologías de reproducción asistida han ayudado a que muchas de las parejas con problemas de infertilidad puedan procrear; sin embargo, tras recurrir a las técnicas de reproducción asistida las fallas en la implantación siguen siendo el principal factor limitante para una gestación exitosa (Matorras *et al.* 2007). Para que la implantación se lleve a cabo adecuadamente es necesario que las acciones coordinadas entre la progesterona ovárica y el estrógeno sean adecuadas y de esta manera promover que el endometrio se encuentre receptivo,

que el embrión sea competente y que exista una comunicación bidireccional entre estos factores.

Debido a que los niveles de gonadotropinas utilizados en los ciclos de FIV son extremadamente altos en comparación con los niveles endógenos de estas hormonas (Ezoe *et al.* 2014), se ha reportado que la administración de éstas afecta la cantidad y calidad de ovocitos obtenidos y al endometrio durante la ventana de implantación alterando sus funciones y de esta manera, comprometiendo la implantación del blastocisto.

### **8.1 Número de embriones recuperados y desarrollo embrionario pre-implantatorio**

En este estudio se observó que la SO tiene un efecto positivo en la producción del número de ovocitos, ya que en las hembras superovuladas y puestas a cruce inmediata se obtuvo un porcentaje de embriones casi cuatro veces mayor al obtenido de las hembras control, también se observó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de embriones viables obtenidos de las hembras tratadas respecto a las que no recibieron tratamiento. En concordancia con lo anterior, en el estudio realizado en mujeres por Peña y colaboradores en el 2002, se observó que la cantidad y la calidad de los ovocitos no se veía afectada negativamente por el tratamiento con gonadotropinas, ya que la cantidad y calidad de los ovocitos recuperados y el número de embriones que se desarrollaron fueron directamente proporcionales a los niveles séricos de estradiol en las pacientes, siendo el grupo con el nivel más alto de donde se obtuvieron mejores resultados.

Por otro lado, estudios en ratones (Ertzeid *et al.* 2001; Ezoe *et al.* 2014) han mostrado que la estimulación ovárica afecta directamente al embrión durante su desarrollo a blastocisto. Mediante su cultivo se ha reportado que el número de embriones que se desarrolla a la etapa de blastocisto es menor en los recuperados de hembras superovuladas que en los recuperados de las hembras control, además, el número de blastocistos recuperados de los cuernos uterinos de las hembras superovuladas a los 4.5 dpc es considerablemente menor al número de blastocistos recuperados de las hembras control. En este trabajo se superovuló a las hembras en las etapas de proestro y estro debido a que Inyawilert y colaboradores en su investigación del 2016 muestran que en los ratones la sincronización del ciclo estral natural y la administración de gonadotropinas puede optimizar la calidad y cantidad de los ovocitos obtenidos, siendo el proestro y el estro (fase folicular) las etapas más convenientes para realizar la administración de gonadotropinas, observaron en las hembras tratadas que durante

estas etapas se encontraban numerosos folículos grávicos preovulatorios, listos para ser ovulados tras la inyección de hCG. Es posible que, como en los estudios de Ertzeid y colaboradores y de Ezoë y colaboradores no se toma en cuenta el ciclo estral de las hembras para la administración de gonadotropinas exógenas, hayan obtenido bajas tasas de embriones desarrollados provenientes de hembras tratadas, puesto que pudieron haber sido superovuladas en cualquier etapa del ciclo estral incluyendo metaestro y diestro, en las cuales se ha encontrado un alto porcentaje de ovocitos sin cúmulos, ovocitos sin su cuerpo polar, ovocitos con agregados mitocondriales intracitoplásmicos y ovocitos con dispersión cromosómica (Inyawilert *et al.* 2016), lo cual refuerza la importancia de saber en qué momento del ciclo estral se realizará la superovulación.

Respecto a las hembras superovuladas y puestas a cruzar una semana después, en este trabajo no encontramos evidencia de que la SO tenga algún efecto negativo a mediano plazo sobre el número de ovocitos producidos, probablemente debido a que después de dos o más ciclos estrales los niveles fisiológicos hormonales ya se han autorregulado gracias a la homeostasis. Tampoco se encontró evidencia de que la SO afecte a mediano plazo el desarrollo embrionario pre-implantatorio a pesar de que existe evidencia (Elbling y Colot, 1985; Huffman *et al.* 2015) de que la SO afecta el desarrollo embrionario antes de la implantación; lo que se sabe es que los esteroides son reguladores de expresión génica y que la calidad de los embriones tiene bases genéticas (Ertzeid y Storeng, 2001), por lo que es necesario realizar estudios de expresión genética en las diferentes etapas del desarrollo embrionario pre-implantatorio para determinar las posibles causas de las altas tasas de mortalidad embrionaria que se obtienen en algunos estudios.

## **8.2 Número de sitios de implantación**

Por otro lado, en contraste con muchos estudios publicados acerca de que la SO tiene efectos adversos sobre las tasas de implantación, en este estudio se reporta que en las hembras tratadas se obtuvo un número significativamente mayor de sitios de implantación respecto a las hembras control, puede ser que la SO afecte positivamente la funcionalidad del endometrio durante el momento de implantación o que, al haber muchos ovocitos de buena calidad y posteriormente embriones de buena calidad, todos o la mayoría logren implantarse correctamente. Peña y colaboradores en el 2002 muestran que las tasas de implantación que obtuvieron fueron similares en sus tres grupos experimentales (Niveles séricos de estradiol: Grupo I: < 1500 pg/ml, grupo II: 1500-3000 pg/ml, grupo III: >3000 pg/ml), haciendo énfasis en que a mayores niveles

séricos de estradiol, mayores tasas de implantación; ellos discuten que en los estudios en humanos, debido a que la mayoría de las mujeres que recurren a técnicas de reproducción asistida presentan problemas de fertilidad, existen múltiples factores que pueden estar involucrados en los fracasos de gestación y no precisamente los niveles suprafisiológicos de gonadotropinas inducidos por la administración exógena.

Sin embargo, Nikas y colaboradores reportaron en 1999 que la estimulación ovárica acelera la formación de pinópodos en el endometrio humano, lo que causa un cambio en la receptividad endometrial; también, en el análisis morfométrico del endometrio durante la peri-implantación realizada por Sikandar y colaboradores en el 2001, se reportó un volumen del epitelio glandular mucho mayor en los ciclos naturales que en los endometrios de las mujeres tratadas con gonadotropinas debido a que las glándulas fueron más numerosas, y se observó una tendencia hacia el descenso del volumen glandular a mayores concentraciones séricas de estradiol debido a un retardo en la actividad secretora de las glándulas. Es probable que, debido a esto, se obtuvieron menores tasas de implantación de ovocitos provenientes de hembras superovuladas y transferidos a receptoras superovuladas con respecto a la de los ovocitos provenientes de hembras control y transferidos a receptoras control.

Un ambiente hormonal aberrante debido a los niveles suprafisiológicos de estrógeno altera la cantidad de receptores de estrógeno y progesterona que deben existir en condiciones normales, por lo que, en consecuencia, se generan múltiples alteraciones durante la gestación, sobre todo en la etapa de implantación. La expresión de genes involucrados en la formación del glicocálix en la superficie de las células epiteliales pueden ser influenciadas por la administración de hormonas exógenas y por lo tanto involucrar al proceso de implantación. MUC1 es una glicoproteína integral de membrana que se encuentra en la superficie de las células epiteliales uterinas de varias especies y como se mencionó, tiene una función de barrera antiadherente del blastocisto al endometrio, se han encontrado grandes cantidades de esta glicoproteína durante la fase pre-receptiva, por lo que se infiere que la disminución de la expresión de *Muc1* es un evento necesario para que se lleve a cabo la implantación (González *et al.* 1999). Inyawilert y colaboradores (2016) mostraron que los niveles de expresión de *Muc1* en las hembras tratadas en metaestro y diestro (fase luteínica) no disminuyeron considerablemente a los 3.5 dpc, lo cual podría ser la respuesta a las bajas tasas de implantación que se obtuvieron en los estudios previamente mencionados y, por el contrario, los niveles de expresión de *Muc1* en las hembras tratadas en proestro y estro sí disminuyeron significativamente a los 3.5 dpc, por lo que ésta podría ser una posible

explicación de los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la superovulación se realizó durante estas etapas.

Por otro lado, existen muy pocos modelos sobre cómo afecta la superovulación en etapas específicas del ciclo estral a la función endometrial y no hay estudios sobre los efectos del tratamiento hormonal a mediano o a largo plazo sobre la implantación del blastocisto. A pesar de que se esperaba que la superovulación tuviese algún efecto a mediano plazo durante la ventana de implantación, en este estudio los resultados obtenidos muestran que la SO no afecta a mediano plazo la función endometrial al momento de la implantación. Sabemos que el útero está compuesto por varios tipos celulares que experimentan ondas sincronizadas de proliferación y diferenciación, éstas están mediadas por el estrógeno y la progesterona ovárica (Ezoe *et al.* 2014) lo cual podría indicar que este tiempo (dos ciclos estrales después) es suficiente para un recambio celular completo del estroma, de la capa basal y de la capa funcional del endometrio.

### **8.3 Número de crías**

Van der Auwera y D'Hooghe (2001) a pesar de observar un mayor número de sitios de implantación en hembras superovuladas y puestas a cruce inmediata respecto a las hembras no tratadas, reportaron camadas más pequeñas y bajo peso fetal en los nacidos provenientes de estas hembras y que fueron transferidos a hembras pseudopreñadas no tratadas. Ertzeid y Storeng (2001) también reportaron un menor número de crías de hembras superovuladas en comparación con las obtenidas de las hembras control; contrario a estos reportes, en este estudio al evaluar el número de nacimientos, se obtuvo el doble del promedio de crías provenientes de hembras superovuladas y puestas a cruce inmediata respecto al promedio de crías obtenidas de las hembras control; debido a que en este grupo se recuperó la mayor cantidad de ovocitos, de embriones desarrollados y la mayor cantidad de sitios de implantación se esperaba que se obtuviesen la mayor cantidad de crías.

Fleming y Yanagimachi (1980) realizaron un estudio en hámsters, en el cual dividieron sus grupos experimentales en cuatro, a cada uno se le realizó el protocolo de superovulación aplicando la primera inyección por la mañana o por la tarde en distintos días del ciclo estral a los diferentes grupos y la segunda inyección de 48 a 56 h después de ésta, reportaron que obtuvieron mejores resultados cuando se superovulaban en los primeros dos días del ciclo estral, es decir, en proestro y estro, sin embargo, en todos los grupos se obtuvieron grandes camadas a pesar de los frecuentes mortinatos o la

mortalidad neonatal el día del parto, siendo 27 el mayor número de crías en una camada, aunque la supervivencia de éstas fue variable dependiendo de otros factores, entre ellos, las habilidades maternas. Otros estudios realizados en ratones también mostraron que las hembras superovuladas tuvieron significativamente un mayor número de crías que las hembras control, aunque muchas de éstas murieron al nacer o poco después (Wilson y Edwards, 1963).

Respecto a las crías obtenidas de las hembras puestas a cruce una semana después de la superovulación y las obtenidas de las hembras control sí se registró una diferencia significativa entre los promedios de ambos grupos, señalando que la superovulación sí tiene un efecto negativo a mediano plazo sobre el número de crías obtenidas.

En la reproducción asistida se realizan administraciones de gonadotropinas de manera repetida y hay pocos estudios en mujeres que analizan las consecuencias que esto conlleva sobre la funcionalidad del endometrio antes, durante y después de la implantación, de igual manera existen pocas investigaciones en modelos biológicos que permitan estudiar el impacto sobre el endometrio del uso de gonadotropinas a mediano y largo plazo y de su uso en repetidas ocasiones.

En este trabajo se estudió el efecto de la superovulación durante la fase folicular a corto plazo sobre la funcionalidad del endometrio y se observó que la administración de gonadotropinas afectó de manera positiva al número de ovocitos recuperados, sin embargo, no afectó aparentemente el desarrollo de éstos al siguiente estadio embrionario, también afectó positivamente al número de sitios de implantación observados y al número de crías obtenidas, por lo tanto, es evidente que las gonadotropinas exógenas afectan de manera positiva a corto plazo las funciones ováricas y endometriales de la madre.

Es posible que la superovulación no tenga efectos a mediano plazo en el desarrollo embrionario pre-implantatorio y tampoco sobre la receptividad endometrial pre-implantatoria aunque, al parecer, sí en el desarrollo embrionario o en la función endometrial post-implantación, lo cual es importante porque no existen estudios moleculares que ayuden a elucidar las causas de este problema que pueden ser cruciales en la mejora de técnicas para la reproducción asistida. Además, gracias a los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que el efecto de la SO no se muestra en el blastocisto, ni en el trofoblasto, ni en el proceso de implantación, sino que la afección se encuentra en la relación que establece el embrión ya implantado con el

endometrio materno. Por lo tanto, es probable que el problema esté en la comunicación que se establece a través de la irrigación sanguínea o de la innervación.

Para averiguarlo y tener resultados con mayor precisión se tendrían que realizar análisis sobre marcadores genéticos implicados en el desarrollo tardío de los embriones de ratón. Aún hay bastantes incógnitas en general sobre el endometrio y los diferentes genes implicados en su funcionalidad y, por supuesto, en las consecuencias que trae consigo el uso de gonadotropinas exógenas sobre estos tejidos, se espera que este trabajo de pie a una nueva línea de investigación que pretenda dilucidar cuáles son las verdaderas implicaciones del uso de los tratamientos de súper ovulación en las técnicas de reproducción asistida utilizados en pacientes.

## 9. CONCLUSIONES

- La superovulación (SO) afecta de manera positiva a corto plazo el número de embriones obtenidos, sin embargo, no afecta su desarrollo embrionario temprano.
- La SO no afecta a mediano plazo el número de embriones obtenidos ni tampoco el desarrollo temprano de éstos.
- La SO afecta de manera positiva a corto plazo el número de sitios de implantación encontrados.
- La SO no afecta a mediano plazo el número de sitios de implantación encontrados.
- La SO afecta de manera positiva a corto plazo el número de crías obtenidas.
- La SO afecta de manera negativa a mediano plazo el número de crías obtenidas.

## 10. PERSPECTIVAS

- Aumentar el tamaño de la muestra y el número de experimentos para determinar con mayor contundencia el efecto de la superovulación a mediano plazo.
- Analizar la expresión de genes asociados con la función endometrial como *Muc1*, *Hoxa10*, *let-7a* y *let-7b*.

- Determinar el efecto a mediano y largo plazo de múltiples dosis de superovulación.

## 11. REFERENCIAS

Aplin, J. 2006. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(6): 833-839.

Achache, H. y A. Revel. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproductive Update*, 12(6): 731–746.

Badgwell, D. y R. Bast. 2007. Early detection of ovarian cancer. *Disease markers*, 23(5-6): 397-410.

Basir, G., W. O, E. Hung y P. Chung. 2001. Morphometric analysis of peri-implantation endometrium in patients having excessively high oestradiol concentrations after ovarian stimulation. *Human Reproduction*, 16(3):435-40.

Beigi, M., M. Salehnia, A. Reza, S. Pourbeiranvand, N. Beigi y S. Ebrahimi. 2010. Effect of Ovarian Stimulation on the Endometrial Apoptosis at Implantation Period. *Iranian Biomedical Journal*, 14(4): 171-177.

Bendel-Stenzel, M., R. Anderson, J. Heasman y C. Wylie. 1998. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(4): 393-400.

Behringer, R., M. Gertsenstein, K. Nagy y A. Nagy. 2014. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EE. UU. 814 pp.

Bloom, W. y Fawcett, D. 1975. A textbook of histology. Editorial W. B. Saunders, EE. UU. 1033 pp.

Botella, J., J. Clavero, M. Escudero, E. Gúrpide, J. Jiménez, F. Nogales, F. Nogales, A. Puerta, J. Sanz y J. Vidart. 1997. El útero. Fisiología y patología. Ediciones Díaz de Santos S. A., España. 420 pp.

Caligioni, C. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current protocols in neuroscience*, Appendix 4:Appendix 4I.

Caravaca, F., J. Castel, J. Guzmán, M. Delgado, Y. Mena, M. Alcalde y P. González. 2005. Bases de la producción animal. Universidad de Sevilla y Universidad de Córdoba, España. 520 pp.

Carlson, B. 2013. Human Embryology and Developmental Biology. Elsevier Inc, EE. UU. 496 pp.

Carter, D. 1993. Preparation of culture media for fertilized one-cell mouse eggs. *Methods in molecular biology*, 18:141-143.

CONtexto Ganadero. 2019. Así se afecta el ciclo estral por el estrés ambiental. Colombia. Disponible en línea en: <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/asi-se-afecta-el-ciclo-estral-por-el-estres-ambiental>. [Consultado por última vez: 05/05/2019].

Coughlan, C., W. Ledger, Q. Wang, F. Liu, A. Demirel, T. Gurgan, R. Cutting, K. Ong, H. Sallam y T. Li. 2014. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reproductive BioMedicine Online*, 28: 14– 38.

Crawford, S., S. Boulet, D. Jamieson, C. Stone, J. Mullen y D. Kissin. 2016. Assisted reproductive technology use, embryo transfer practices, and birth outcomes after infertility insurance mandates: New Jersey and Connecticut. *Fertility and sterility*, 105(2): 347-355.

De Costa, J., J. Madrid y S. Zamora. 1993. Manual de clases prácticas de fisiología animal. Secretariado de publicaciones Universidad de Murcia, España. 236 pp.

Dey, S., H. Lim, S. Das, J. Reese, B. Paria, T. Daikoku y H. Wang. 2004. Molecular cues to implantation. *Endocrine Reviews*, (3):341-73.

Diao, H., B. Paria, S. Xiao y X. Ye. 2011. Temporal expression pattern of progesterone receptor in the uterine luminal epithelium suggests its requirement during early events of implantation. *Fertility and Sterility*, 95:2087–2093.

Drucker, R. 2006. Fisiología médica. Manual Moderno, México. 938 pp.

- Elbling, L. y M. Colot. 1985. Abnormal development and transport and increased sister-chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice. *Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(4): 189-195.
- Ertzeid, G. y R. Storeng. 2001. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction*, 16(2): 221-225.
- Ezoe, K., T. Daikoku, A. Yabuuchi, N. Murata, H. Kawano, T. Abe, T. Okuno, T. Kobayashi y K. Kato. 2014. Ovarian stimulation using human chorionic gonadotrophin impairs blastocyst implantation and decidualization by altering ovarian hormone levels and downstream signaling in mice. *Molecular human reproduction*, 20(11):1101-1116.
- Farquhar, C. y J. Marjoribanks. 2018. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8) Art. No.: CD010537.
- Fleming, A. y R. Yanagimachi. 1980. superovulation and superpregnancy in the golden hamster. *Development, growth and differentiation*, 22(2): 103-112.
- Flores, L., T. Hildebrandt, A. Kühl y B. Drews. 2014. Early detection and staging of spontaneous embryo resorption by ultrasound biomicroscopy in murine pregnancy. *Reproductive biology and endocrinology*, 12:38.
- Fowler, W. y D. Mutch. 2008. Management of endometrial cancer. *Women's Health*, 4(5): 479–489.
- Fu, TY., CT. Lin y PC. Tang. 2011. Steroid hormone-regulated let-7b mediates cell proliferation and basigin expression in the mouse endometrium. *Journal of Reproduction and Development*, 57:627–35.
- Gellersen, B. y J. Brosens. 2014. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine Reviews*, 35(6):851-905.
- Geraedts, J. y G. De Wert. 2009. Preimplantation genetic diagnosis. *Clinical Genetics*, 76: 315–325.

Gilbert, S. y M. Barresi. 2019. *Developmental biology*. Oxford University Press Inc, EE.UU. 888 pp.

Glujovsky, D., C. Farquhar, A. Quinteiro, C. Alvarez y D. Blake. 2016. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *The Cochrane database of systematic reviews*, (6):CD002118.

González, B. y V. Olguín. 2017. Concordancia entre el estudio preoperatorio y definitivo en cáncer de endometrio. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55 Supl 1: S26-S33.

González, R., A. Palomino, A. Boric, M. Vega, y L. Devoto. A quantitative evaluation of alpha1, alpha4, alphaV and beta3 endometrial integrins of fertile and unexplained infertile women during the menstrual cycle. A flow cytometric appraisal. *Human Reproduction*, 1999;14:2485–92.

Greaves, E., F. Cousins, A. Murray, A. Esnal, A. Fassbender, A. Horne y P. Saunders. 2014. A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium. *The American Journal of pathology*, 184(7):1930-1939.

Gravetter, F. y L. Wallnau. 2016. *Essentials of Statistics for the Social and Behavioral Sciences*. Cengage Learning, EE.UU. 768 pp.

Guzeloglu-Kayisli, O., M. Basar y A. Arici. 2007. Basic aspects of implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 15(6): 728-739.

Haouzi, D., S. Assou, K. Mahmoud, S. Tondeur, T. Rème, B. Hedon, J. De Vos y S. Hamamah. 2009. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Human Reproduction*, 24(6): 1436-1445.

Hasegawa, A., K. Mochida, H. Inoue, Y. Noda, T. Endo, G. Watanabe y A. Ogura. 2016. High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. *Biology of reproduction*, 94(1):21, 1–8.

Hill, R., G. Wyse y M. Anderson. 2004. *Animal Physiology*. Oxford University Press Inc., EE. UU. 985 pp.

Hedrich, H. 2012. *The laboratory mouse*. Academic Press, Reino Unido; EE. UU. 868 pp.

Hoffman, L., G. Olson, D. Carson y B. Chilton. 1998. Progesterone and Implanting Blastocysts Regulate Muc1 Expression in Rabbit Uterine Epithelium. *Endocrinology*, 139(1): 266-271.

Hoozemans, D., R. Schats, R. Homburg y P. Hompes. 2004. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(6): 691-715.

Huffman, S., Y. Pak y R. Rivera. 2015. Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Molecular reproduction & development*, 82:207–217.

Inyawilert, W., TY. Fu, CT. Lin y PC. Tang. 2015. Let-7-mediated suppression of mucin 1 expression in the mouse uterus during embryo implantation. *Journal of Reproductive Biology*, 61(2):138-44.

Inyawilert, W., YJ. Liao y PC. Tang. 2016. Superovulation at a specific stage of the estrous cycle determines the reproductive performance in mice. *Journal of Reproductive Biology*, 16(4): 279-286.

Johnson, M. 2013. *Essential Reproduction*. Wiley-Blackwell, Reino Unido. 379 pp.

Schlafer, D. y R. Foster. 2016. 'Female genital system' in Jubb, Kennedy and Palmer's *Pathology of Domestic Animals*. Maxie, M.G. (ed.), Londres. 476 pp.

Kalem, Z., M. Kalem y T. Gürkan. 2016. Methods for endometrial preparation in frozen-thawed embryo transfer cycles. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 17(3):168-172.

Koot, Y., G. Teklenburg, M. Salker, J. Brosens y N. Macklon. 2012. Molecular aspects of implantation failure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822(12):1943-1950.

Latham, M. y H. Taylor. 2012. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 39(4): 535-49.

Lessey, B. y J. Kim. 2017. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertility and sterility*, 108(1):19-27.

López, M. 2012. Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora. Fisiología de la pubertad y del climaterio. Complejo Hospitalario Universitario Albacete, España. 15 pp.

Macer, M. y H. Taylor. 2012. Endometriosis and Infertility: A review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 39(4): 535–549.

Matorras, R., J. Hernández y D. Molero. 2008. Tratado de reproducción humana para enfermería. Editorial Médica Panamericana, Argentina; España. 626 pp.

Mehedintu, C., M. Plotogea, S. Lonescu y M. Antonovici. 2014. Endometriosis still a challenge. *Journal of Medicine and Life*, 7(3): 349–357.

Meseguer, M., A. Pellicer y C. Simón. 1998. MUC1 and endometrial receptivity. *Molecular Human Reproduction*, 4(12): 1089-1098.

Miravet, J., M. Ruiz, E. Gómez y J. Garcia. 2017. Endometrial receptivity in eutopic endometrium in patients with endometriosis: it is not affected and let me show you why. *Fertility and sterility*, 108(1): 28-31.

Montalvo, G., D. Isla, G. Solorza, D. Cantú, A. González, D. Muñoz, J. Robles, A. Mota, D. Gallardo, F. Morales, L. Cetina, J. Coronel y A. Herrera. 2011. Oncoguía: Cáncer de endometrio. *Cancerología*, 6: 47-52.

National Health Service Trust Fundation. 2018. Fertility. Disponible en línea en: <https://www.nhs.uk/conditions/ivf/availability/>. [Consultado por última vez el 25/12/2019].

Nikas, G. 1999. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Human Reproduction*, 4 Suppl 2: 99-106.

Norman, R., M. Noakes, R. Wu, M. Davies, L. Moran y J. Wang. 2004. Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. *Human Reproduction Update*, 10(3): 267-80.

Norwitz, E., D. Schust y S. Fisher. 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *The new England Journal of medicine*, 345(19): 1400-1408.

Park, S., T. Kim, J. Kim, K. Chang, H. Lee y D. Lee. 2015. Repeated superovulation via PMSG/hCG administration induces 2-Cys peroxiredoxins expression and overoxidation in the reproductive tracts of female mice. *Molecules and cells*, 38(12): 1071–1078.

Peña, J., P. Chang, LK. Chan, K. Zeitoun, M. Thornton 2nd y M. Sauer. 2002. Supraphysiological estradiol levels do not affect oocyte and embryo quality in oocyte donation cycles. *Human reproduction*, 17(1): 83-87.

Plant, T. y A. Zeleznik. 2015. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier Inc., EE. UU. 2684 pp.

Ramathal, C., I. Bagchi, R. Taylor y M. Bagchi. 2010. Endometrial decidualization: of mice and men. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(1): 17–26.

Ren S., X.Wang, B. Ma, Q. Yuan, H. Zhang, X. Yu y A. Hao. 2011. Arnebia preventing the expression of Muc1 protein decrease results in anti-implantation in early pregnant mice. *Contraception*, 83(4):378-384.

Rosas, M. 2008. Infertilidad femenina. Un problema multifactorial. *Offarm*. 27(8): 90-98.

Ross, M. y W. Pawlina. 2016. Histología. Texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular. Wolters Kluwer, España. 1052 pp.

Sadler, T. 2012. Langman's medical embryology. Lppincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, EE. UU. 384 pp.

Senapati, S. F. Wang, T. Ord, C. Coutifaris, R. Feng y M. Mainigi. 2018. Superovulation alters the expression of endometrial genes critical to tissue remodeling and placentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(10):1799-1808.

Simón, C. J. Martín y A. Pellicer. 2000. Paracrine regulators of implantation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14(5): 815-826.

Sharma, A. y P. Kumar. 2012. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 5(1): 2-6.

Sharkey, A y S. Smith. 2003. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 17(2): 289-307.

Stouffer, R. y M. Zelinski-Wooten. 2004. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: quality vs quantity. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16;2: 32.

Taft, R. 2017. In Vitro Fertilization in Mice. *Cold Spring Harbor Protocols*, (11):pdb.prot094508.

Takeo, T. y N. Nakagata. 2015. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PLoS one*, 10(5):e0128330.

Timeva, T., A. Shterev y S. Kyurkchiev. 2014. Recurrent Implantation Failure: The Role of the Endometrium. *The Journal of Reproduction & Infertility*, 15(4): 173-183.

The ESHRE Guideline Group on POI, L. Webber, M. Davies, R. Anderson, J. Bartlett, D. Braat, B. Cartwright, R. Cifkova, S. de Muinck, E. Hogervorst, F. Janse, L. Liao, V. Vlaisavljevic, C. Zillikens y N. Vermeulen. 2016. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 31(5): 926-937.

Thomas, K., A. Thomson, V. Sephton, C. Cowan, S. Wood, G. Vince, C. Kingsland y D. Lewis-Jones. 2002. The effect of gonadotrophic stimulation on integrin expression in the endometrium. *Human Reproduction*, 17(1): 63-68.

Tsuchiya, Y., Y. Saito, S. Taniuchi, A. Sakuma, T. Maekawa, H. Fukamachi, S. Takeuchi y S. Takahashi. 2012. Runx3 expression and its roles in mouse endometrial cells. *Journal of Reproductive Biology*, 58(5):592-8

University of California Museum of Paleontology & National Center for Science Education. 2014. Understanding evolution. Disponible en línea en: <https://evolution.berkeley.edu/evolibrary/glossary/glossary.php>. [Consultado por última vez: 03/01/2019].

Vargas, B., D. Ambriz, M. Navarro, A. Trejo, G. Rodríguez y M. González. 2018. Manejo de animales del bioterio de la UAM-I. México. Disponible en línea en: <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/BIOTERIO.pdf>. [Consultado por última vez: 05/05/2019].

Van der Auwera, I. y T. D'Hooghe. 2001. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human reproduction*, 16(6): 1237-1243.

Vaseghi, H., A. Moghiseh, M. Sepehrimanesh, M. Kafi y M. Nooranizadeh. 2017. Super pregnancy in a BALB/c mouse superovulated with PMSG. *Laboratory animal research*, 33(3): 280–282.

Villaquirán, A., M. Dolz, S. Rogel y Z. Salvador. 2020. Las técnicas de reproducción asistida: diferencias y complejidad. Disponible en línea en: <https://www.reproduccionasistida.org/las-tecnicas-de-reproduccion-asistida/>. [Consultado por última vez: 30/01/2021].

Wilson, E. y R. Edwards. 1963. Parturition and increased litter size in mice after superovulation. *Journal of reproduction and fertility*, 5:179-186.